

ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESTOQUES REPRODUTORES DE
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS NO BRASIL

PATRÍCIA DOMINGUES DE FREITAS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução

**ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ESTOQUES REPRODUTORES DE
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS NO BRASIL**

Patrícia Domingues de Freitas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

**São Carlos, SP
2003**

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

F866ed

Freitas, Patrícia Domingues de.

Estudos de diversidade genética em estoques reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil / Patrícia Domingues de Freitas . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Genética. 2. Variabilidade genética. 3. *Litopenaeus vannamei*. 4. RAPD. 5. Camarão. 6. Aqüicultura I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

*É preciso provocar sistematicamente
confusão. Isso promove a
criatividade. Tudo aquilo que é
contraditório gera vida.*

Salvador Dali

*A imaginação é mais importante
que os conhecimentos.*

Albert Einstein

Dedico esta Tese ao grande amor da minha vida e ao fruto desse amor, que apesar de ainda ser uma sementinha já desperta em mim o maior e mais nobre dos sentimentos, me fazendo crer que "o amor é uma aspiração à plenitude do ser, tanto dos sentidos como da inteligência".

"Um amor mais forte que tudo, mais obstinado que tudo, mais duradouro que tudo, é somente o amor de mãe"

Paul Raynal

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta Tese de Doutorado significa para mim muito mais do que a obtenção de um título. É a concretização de um sonho, que caminha comigo desde os tempos de adolescente, quando saí de Salvador em 1992 para estudar Biologia em São Carlos.

Vim para o estado de São Paulo com o objetivo não somente de ser bióloga, mas, sobretudo, de estudar Genética e fazer Ciência. Dez anos se passaram e durante este período senti muitos medos e frustrações, mas, principalmente, saudades. Saudades de tudo e de todos que havia deixado. Conquistei, no entanto, novas e grandes amizades. Tive tantas experiências pessoais e profissionais. Vivi momentos únicos e tão especiais que me fizeram crer, e continuam me fazendo acreditar, que nenhum sacrifício é em vão se reflete o que realmente vem da alma e se é feito, de fato, com o coração.

Portanto, gostaria hoje de demonstrar a minha profunda gratidão, compartilhando os meus sentimentos e registrando aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de maneira efetiva para a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, ao Laboratório de Citogenética e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, do Departamento de Genética e Evolução, por possibilitar o desenvolvimento pleno do meu doutorado;

À secretaria do Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução e suas respectivas funcionárias: Rose, Regiane e Tatiana, que sempre se mostraram solícitas e prestativas, auxiliando da melhor maneira possível na

AGRADECIMENTOS

resolução de todos os procedimentos burocráticos necessários ao pleno desenvolvimento do meu doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo suporte financeiro e pela bolsa de doutorado concedida durante o período de setembro 1999 a agosto de 2003, fundamentais à execução deste trabalho;

À Associação Brasileira de Criadores de Camarão, também pelo efetivo suporte financeiro e pelo apoio técnico, imprescindíveis à realização da coleta de material e aos experimentos em laboratório;

Ao Laboratório de Larvicultura Aquatec (Rio Grande do Norte), a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte, Emparn (Rio Grande do Norte), a Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC (Santa Catarina) e às Fazendas de Camarão: Valença da Bahia Maricultura (Bahia), Lusomar (Bahia), Compar (Paraíba) e Aquamaris (Paraíba), pela obtenção das amostras e inúmeras informações fornecidas;

Aos Professores Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo e Dr. Orlando Moreira Filho que, mesmo com personalidades tão extremas, conseguem manter o nosso ambiente de trabalho em equilíbrio e perfeita harmonia;

Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos e, em particular, àqueles que mais do que colegas se fizeram também amigos.

Tê, Vitinho, Célia, Ká e Elô, vocês se tornaram pessoas especiais...

AGRADECIMENTOS

Gostaria também de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, que além de conselheiro e maior amigo é também o grande amor da minha vida. Te agradeço por toda a confiança e incentivo profissionais a mim depositados. Seu dinamismo, inquietação e amor à Ciência são ensinamentos que carregarei para minha vida como exemplo profissional. Você me fez acreditar que, mesmo já tendo feito tanto, haverá sempre algo ainda por fazer... Te admiro pelo seu enorme senso ético e pelo grande pesquisador que é e te amo por tudo o que você significa para mim.

*"Você é assim, um sonho pra mim
E quando não te vejo eu penso em você
Desde o amanhecer até quando eu me deito*

*Eu gosto de você
E gosto de ficar com você
Meu riso é tão feliz contigo
Meu melhor amigo é o meu amor*

*E a gente canta e a gente dança
E a gente não se cansa de ser criança
A gente brinca com a nossa velha infância*

*Seus olhos meu clarão
Me guiam dentro da escuridão
Seus pés me abrem os caminhos
Eu sigo e nunca me sinto só*

*Você é assim, um sonho pra mim
Quero te encher de beijos...
Você é assim, um sonho pra mim, você é assim..."*

AGRADECIMENTOS

Finalmente gostaria de agradecer a minha família, pessoas pelas quais nutro um sentimento que vai além da razão.

Não somos o que somos ou sentimos o que sentimos por que escolhemos. Algo em nós transcende as nossas vontades e os nossos sentimentos. Amar alguém tão profundamente não tem explicação nem respostas. Amamos por que simplesmente amamos e por que estas pessoas, com todos os seus defeitos, mas também qualidades, significam algo muito importante nas nossas vidas.

Uma força maior faz com que nos mantenhamos eternamente ligados. Mesmo tão distantes continuamos eternamente próximos. Ligados por momentos importantes compartilhados, ligados por sentimentos que extrapolam a nossa existência.

Vocês fazem parte de mim, de todos os meus sonhos e anseios. Senti e continuo sentindo a ausência de vocês na minha vida. Nos momentos mais simples. Nos finais de semana. Nos dias que vão e que vem e vocês não estão por perto. Penso em todos os momentos que perdi. Nos meus sobrinhos nascendo e crescendo. Nos momentos difíceis. Nos natais. Em tudo.

Sinto tanta falta e choro. Mas sempre volto a sorrir. Sorrio por que sei e tenho a certeza de que o amor que existe entre nós é eterno e haja o que houver terei vocês sempre ao meu lado, mesmo estando tão distante.

Agradeço a minha família e ao meu amor por tornarem a minha vida mais especial. Esta tese não é só minha...

AGRADECIMENTOS

*"Eu tenho tanto pra lhe(s) falar
Mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por você(s)*

*E não a nada pra comparar
Para poder lhe(s) explicar
Como é grande o meu amor por você(s)*

*Nem mesmo o céu, nem as estrelas
Nem mesmo o mar e o infinito
Não é maior
E nem mais bonito*

*Me desespero a procurar
Alguma forma de lhe(s) falar
Como é grande o meu amor por você(s)*

*Nunca se esqueça(m)
Nenhum segundo
Que eu tenho o amor maior do mundo
E como é grande
O meu amor por você(s)..."*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	I
RESUMO	V
ABSTRACT	VII

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Caracterização do Problema_____	02
1.2. Estabelecimento dos Objetivos_____	04
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. A Aqüicultura_____	07
2.1.1. Aspectos Econômicos, Sociais e Ambientais_____	07
2.2. A Espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> _____	12
2.2.1. Taxonomia e Morfologia_____	12
2.2.2. Distribuição e Reprodução_____	18
2.2.3. Importância Econômica_____	20
2.3. O Cultivo de Camarão Marinho_____	22
2.3.1. Histórico_____	22
2.3.2. Manejo em Cativeiro_____	24
2.3.3. Desenvolvimento Sustentável_____	26
2.4. Estudos Genéticos na Aqüicultura_____	29
2.4.1. Aplicação e Potencialidades_____	29
2.4.2. Marcadores Moleculares_____	34
2.4.2.1. A Técnica de RAPD_____	37
2.5. Estudos Genéticos em Camarão_____	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Coleta do Material_____	45
3.2. Extração de DNA de Tecidos Sólidos_____	50
3.3. Quantificação de DNA_____	53
3.4. Acondicionamento das Amostras_____	54
3.5. Reações de Amplificação de DNA via PCR_____	55
3.5.1. Análise Eletroforética dos Fragmento Amplificados_____	61
3.6. Análises Estatísticas Multilocus_____	62
4. RESULTADOS	
4.1. Diagnóstico de Origem, Geração e Manejo_____	67
4.1.1. Fundação dos Plantéis: geração e origem_____	67
4.1.2. Manutenção dos Plantéis: seleção e manejo _____	69
4.2. Análise de Diversidade e Distância Genética Para os Diferentes Estoques Reprodutores Analisados com Base na Identificação de Marcadores Moleculares de RAPD_____	71

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

4.2.1.	Relações de Diversidade e Distância Genética Estabelecidas para 15 Diferentes Plantéis de Reprodutores_____	73
4.2.2.	Verificação de Perda de Variabilidade Genética ao Longo de Cinco Gerações Endocruzadas Produzidas em Cativoiro_____	84
5.	DISCUSSÃO_____	93
6.	CONCLUSÕES_____	104
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS_____	108
8.	ANEXO_____	122

Figura 1: Esquema representativo da morfologia externa do camarão marinho (retirado de Burukovskii, 1985), ilustrando a região do cefalotórax (A); a região abdominal com os somitos individualizados (B); a extremidade caudal em forma de leque, constituída pelo telso e urópodos (C); os pleópodos (D); os pereiópodos (E); as antenas (F); as antênulas (G) e o rostro serrilhado, composto por nove dentes (H).

(PÁGINA 16)

Figura 2: Ciclo reprodutivo do camarão marinho, exemplificando as principais etapas de desenvolvimento: reprodutor desovando (A), ovo (B), náuplio (C), zoea (D), misis (E), pós-larva (F), juvenil (G) e adulto (H).

(PÁGINA 19)

Figura 3: Esquema representativo da cadeia produtiva de camarões marinhos, evidenciando as fases de maturação, larvicultura, processamento e comercialização.

(PÁGINA 24)

Figura 4: Mapa do Brasil evidenciando os locais de coleta a onde foram amostrados os diferentes plantéis de reprodutores estudados no presente trabalho.

(PÁGINA 47)

Figura 5: Fotografia da porção ventral de dois exemplares adultos de camarões *Litopenaeus vannamei*, indicando a presença de petasma nos machos (a) e de tégico nas fêmeas (b).

(PÁGINA 48)

Figura 6: Gel de agarose evidenciando padrão de amplificação de DNA obtido para diferentes amostras analisadas (a, b, c, d), utilizando-se os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em reações de RAPD.

(PÁGINA 71)

Figura 7: Gel de agarose demonstrando o perfil de repetibilidade dos fragmentos de DNA obtidos a partir de uma única amostra de DNA de camarão amplificada com os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em três sucessivas reações de PCR.

(PÁGINA 73)

Figura 8: Dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA, construído com base nos valores de distância e identidade genética de Nei obtidos para os diferentes plantéis analisados.

(PÁGINA 83)

Figura 9: Dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA, construído com base nos valores de distância e identidade genética de Nei obtidos para as gerações F5, F6, F7, F8 e F9.

(PÁGINA 89)

Figura 10: Gráfico de regressão não linear determinado a partir dos valores de similaridade genética de Jaccard versus o número de gerações de cada linhagem analisada.

(PÁGINA 90)

Figura 11: Gráfico de regressão não-linear determinado a partir dos valores de similaridade genética de Jaccard obtidos para os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 versus o número de gerações de cada linhagem analisada.

(PÁGINA 91)

Tabela 1: Distribuição das fazendas de engorda e laboratórios de produção de pós-larvas de camarões marinhos existentes no Brasil.

(PÁGINA 11)

Tabela 2: Classificação taxonômica atribuída às diversas espécies de camarões marinhos pertencentes ao gênero *Penaeus*, após revisão realizada por Pérez-Farfante e Kensley (1997).

(PÁGINA 14)

Tabela 3: Descrição da localização e função de algumas das principais estruturas que compõem o corpo dos camarões.

(PÁGINA 17)

Tabela 4: Relação dos laboratórios de larvicultura visitados, dos plantéis coletados, das nomenclaturas adotadas e do número de registro de cada animal amostrado.

(PÁGINA 48)

Tabela 5: Questionário técnico direcionado ao setor de maturação dos laboratórios de produção de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*.

(PÁGINA 49)

Tabela 6: Seqüência dos *primers* de RAPD utilizados no presente trabalho.

(PÁGINA 59)

Tabela 7: Diagnóstico de origem e geração para os diferentes plantéis estudados, com base nas respostas obtidas através da aplicação do guia de entrevistas.

(PÁGINA 68)

Tabela 8: Nomenclatura adotada e peso molecular estimado para os diferentes fragmentos amplificados, através da utilização dos *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em reações de RAPD.

(PÁGINA 72)

Tabela 9: Número total de bandas e de fragmentos polimórficos identificados para cada um dos estoques reprodutores analisado.

(PÁGINA 74)

Tabela 10: Valores de diversidade genética de Nei determinados para os diferentes plantéis analisados.

(PÁGINA 75)

Tabela 11: Coeficientes de similaridade genética de Jaccard e desvio padrão médio determinados para os 15 plantéis de reprodutores analisados.

(PÁGINA 77)

Tabela 12: Valores de freqüência gênica de Nei e percentagem de locos polimórficos determinados para os diferentes plantéis analisados.

(PÁGINA 79)

Tabela 13: Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei calculados para os diferentes plantéis analisados.

(PÁGINA 82)

Tabela 14: Total de locos analisados, percentagem e número de locos polimórficos por *primer* em cada geração endocruzada analisada.

(PÁGINA 84)

Tabela 15: Coeficientes de similaridade genética de Jaccard determinados para os plantéis em geração F5, F6, F7, F8 e F9.

(PÁGINA 85)

Tabela 16: Valores de diversidade gênica de Nei calculados para as cinco gerações endocruzadas.

(PÁGINA 86)

Tabela 17: Valores de frequência gênica de Nei, percentagem de locos polimórficos para cada geração e teste de homogeneidade, baseado na determinação do qui-quadrado (χ^2) e na probabilidade (p) de erro, com $p < 0,05$.

(PÁGINA 88)

Tabela 18: Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei estabelecidos para as diferentes gerações analisadas

(PÁGINA 89)

Tabela 19: Valores de variância, desvio padrão e coeficientes de variação determinados com base nos coeficientes de similaridade genética de Jaccard obtidos para os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 analisados separadamente.

(PÁGINA 91)

RESUMO

A identificação de marcas genéticas pode fornecer informações a respeito da distribuição da variabilidade genética em relação ao tamanho da população e à geração parental, além de discriminar linhagens e/ou indivíduos. Pesquisas realizadas em diferentes espécies de camarões cultivados estão demonstrando que o monitoramento regular do nível da variabilidade genética dos estoques, através da identificação de marcadores moleculares, é essencial para orientação adequada do manejo. No presente trabalho, marcadores baseados na análise de RAPD foram utilizados para avaliar a diversidade genética e determinar relações de divergência e identidade entre diferentes estoques reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil. A extração do DNA foi realizada de acordo com Sambrook *et al.* (1989) e as reações de PCR utilizando-se o *Kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads* (Amersham Pharmacia Biotech). Foram determinadas as percentagens de locos polimórficos, as freqüências alélicas, os índices de diversidade, distância e identidade genética de Nei e construídos dendogramas de similaridade genética, através da utilização do programa POPGENE, versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). O coeficiente de similaridade genética de Jaccard, o qual não considera a ausência de bandas como indicativo de similaridade, foi calculado utilizando-se o programa NTSYS, versão 2.0 (Rohlf, 1993). Foi analisado um total de 332 exemplares provenientes de 19 estoques reprodutores, sendo cinco destes pertencentes a uma única linhagem de endocruzamento. Sessenta e quatro fragmentos foram identificados quando um conjunto de seis *primers* foi utilizado em reações de RAPD-PCR. Os índices de similaridade e diversidade genética demonstraram uma reduzida variabilidade para plantéis em fase

inicial de domesticação. A análise de distância e identidade genética evidenciou grande proximidade genética entre os estoques cultivados, não sendo observadas divergências significativas. Os valores obtidos para a linhagem de endocruzamento revelaram uma progressiva diminuição nos níveis de variação genética ao longo das gerações. O dendrograma obtido demonstrou que à medida que a geração avança, esta vai modificando sua estrutura genética e se distanciando cada vez mais das populações iniciais. Segundo a análise de regressão não-linear, caso esta tendência seja mantida, os níveis de variação genética poderão assumir valores próximos a zero antes mesmo deste plantel atingir a 19ª geração. Os dados moleculares obtidos no presente trabalho reforçam a suposição de que o tipo de manejo atualmente realizado pelos laboratórios de larvicultura do Brasil, para abertura e manutenção dos estoques reprodutores de *L. vannamei*, propicia a diminuição nos níveis de diversidade genética das populações cativas. O desenvolvimento de linhagens geneticamente divergentes e de programas de cruzamentos dirigidos poderá contribuir para o estabelecimento de estratégias de manejo mais apropriadas.

ABSTRACT

The identification of genetic marks can provide information about the distribution of genetic variability in relation to populational size and parental generation, besides the discrimination of lines and/or individuals. Researches carried out in different shrimp species reared at captivity have demonstrated that a regular monitoring of the genetic variability levels of stocks, through identification of molecular markers, is essential to an adequate management orientation. In the present work, RAPD markers were used to evaluate the genetic diversity and to determine the divergence and identity relationships among different broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* reared at Brazil. The DNA extraction was performed according to Sambrook *et al.* (1989) and PCR reactions were accomplished by using the kit *Ready-To-Go RAPD Analysis Beads* (Amersham Pharmacia Biotech). The percentage of polymorphic loci, allele frequencies, diversity indexes, and Nei's genetic distance and identity were determined; and dendrograms of genetic similarity were built, by using the software POPGENE, version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). The Jaccard's genetic similarity coefficient, which ignores the absence of band as an indicator of similarity, was calculated by using the software NTSYS, version 2.0 (Rohlf, 1993). A total of 332 individuals from 19 broodstocks were analyzed, five of them belonging to a same inbred line. Sixty-four fragments were identified when a set of six primers was adopted to perform RAPD-PCR. The genetic diversity and similarity indexes demonstrated a reduced variability in stocks at initial domestication process. The analysis of genetic distance and identity evidenced that the reared stocks are closely related, lacking significant divergences. The values obtained in the inbreeding line revealed a progressive decreasing of genetic variation

ABSTRACT

throughout the generations. The dendrogram demonstrated that as long as the generation increases, the genetic structure changes and becomes more and more distant from that observed in the first populations. According to analysis by non-linear regression, if this tendency is maintained, the levels of genetic variation can get close to zero before the stock reaches the 19th generation. The molecular data obtained in the present work reinforce the suggestion that the management nowadays carried out by Brazilian larviculture laboratories to compose and maintain broodstocks of *L. vannamei*, leads to a reduction of the levels of genetic diversity of captive populations. The development of genetically divergent lines and crossbreeding programs might contribute to the establishment of more adequate strategies.

INTRODUÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

1.1. Caracterização do Problema

A temática deste trabalho está inserida numa ampla proposta de se estabelecer uma base de informações genéticas sobre a espécie *Litopenaeus vannamei*, considerada, hoje, a principal espécie de camarão marinho cultivada no Brasil. Esta espécie, nativa do oceano Pacífico, foi introduzida no país na década de 80 com a finalidade de subsidiar o desenvolvimento da carcinicultura brasileira. Atualmente, ela corresponde a praticamente 100% do total de camarões produzido no Brasil, decorrente da atividade de aqüicultura.

Por ser uma espécie exótica, os primeiros reprodutores de *L. vannamei* foram obtidos através da importação de animais selvagens, provenientes de diferentes países localizados na costa do Pacífico, como México, Equador e Panamá. Entretanto, em 1997 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) decretou uma lei restringindo a importação de crustáceos, moluscos, macrófitas e peixes, salvo àqueles destinados a aquariofilia. Segundo o decreto, que considera que a maior parte da produção brasileira de pescado, oriunda da aqüicultura, é constituída por espécies exóticas, o impacto que as translocações poderiam vir a causar sob o meio ambiente e biodiversidade nativa tornou necessário o estabelecimento de normas de conduta para importação de qualquer espécie exótica.

INTRODUÇÃO

Apesar do IBAMA, juntamente com o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAA), possibilitar a eventual importação de alguns espécimes destinados ao cultivo, incluindo os camarões, a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) decidiu pela recomendação de não importar novos indivíduos reprodutores. Esta conduta, que vem sendo fielmente praticada, se baseou, fundamentalmente, nos prováveis danos, muitos deles irreversíveis, que a introdução de patógenos exógenos poderia vir a causar na atividade de carcinicultura no Brasil. Assim, desde 1998, não tem ocorrido a introdução de camarões *L. vannamei* selvagens no país e os estoques reprodutores desta espécie têm sido mantidos, exclusivamente, através da utilização de animais nascidos no próprio cativeiro. A continuidade desses estoques é assegurada através do cruzamento entre os indivíduos pertencentes a um mesmo plantel que, conseqüentemente, passa para uma geração subsequente. Esta conduta, apesar de possibilitar ao produtor a manutenção da performance adquirida, por um determinado período de tempo, se realizada de maneira inadequada, pode, a médio e longo prazo, promover uma perda significativa nos níveis de variabilidade genética, uma vez que as gerações produzidas em cativeiro tendem a aumentar o grau de consangüinidade.

Pesquisas realizadas em diferentes espécies de camarões cultivados estão demonstrando que o monitoramento regular do nível da variabilidade genética dos estoques é essencial para orientação adequada do manejo aplicado. Hoje dispomos de vários métodos para detecção da variabilidade genética, destacando-se as técnicas moleculares de DNA. A

grande vantagem desses métodos é que, além do monitoramento da variabilidade genética, permitem também a caracterização de linhagens, o diagnóstico e controle de doenças, o estudo de distâncias genéticas e o melhor aproveitamento de programas de melhoramento genético.

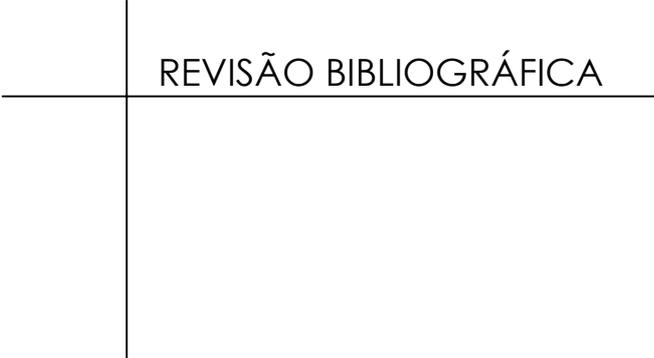
1.2. Estabelecimento dos Objetivos

Após ter desenvolvido minha dissertação de mestrado, durante o período de 1997-1999, determinando a similaridade genética entre dois estoques de camarões cultivados, com origens e estágios de domesticação diferenciados (Venezuela em F17 e Panamá em F3), através da utilização de marcadores moleculares multilocos, baseados em minissatélites, ficou estabelecido que durante o meu doutorado daríamos continuidade aos estudos de variabilidade genética em camarões da espécie *L. vannamei*. A participação do setor produtivo foi decisiva para definição dos objetivos de trabalho propostos. A maior dificuldade na época foi eleger a ferramenta molecular a ser utilizada, uma vez que na literatura não havia dados disponíveis suficientes para utilizarmos marcadores de microsatélites, considerados mais apropriados em virtude do seu comportamento co-dominante. Uma alternativa foi optar pela utilização de *primers* de seqüências arbitrárias (marcadores de RAPD), os quais não necessitariam de conhecimento prévio da estrutura do genoma da espécie a ser estudada.

Assim, ficaram estabelecidos como principais objetivos de trabalho:

- (1)** Determinar os níveis de diversidade genética de alguns dos principais plantéis de reprodutores de *L. vannamei* existentes no Brasil, analisando as relações de distância genética existentes entre estes, através da identificação de marcadores moleculares de RAPD;
- (2)** Verificar a perda de variabilidade genética em um plantel comercial, observando o seu comportamento ao longo das gerações produzidas em cativeiro, também, através da utilização da técnica de RAPD-PCR;
- (3)** Realizar um diagnóstico de origem e de manejo dos plantéis de reprodutores estudados, correlacionando as informações obtidas com os dados produzidos com base nas marcas moleculares identificadas.

Os objetivos de trabalho propostos fazem parte de um conjunto de ações que visam auxiliar o desenvolvimento de estratégias de manejo mais adequadas, que possibilitem um melhor monitoramento dos estoques reprodutores da espécie *L. vannamei* no Brasil, contribuindo com a manutenção e sustentabilidade da atividade de cultivo de camarões marinhos e com a expansão deste setor que, nos últimos anos, vem assumindo uma posição de destaque, passando a ser considerada como uma das atividades com maior potencial de desenvolvimento econômico e social dentro do Agronegócio Brasileiro.



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Aqüicultura

2.1.1. Aspectos Econômicos, Sociais e Ambientais

A aqüicultura, atividade que se destina ao cultivo de organismos aquáticos, surgiu na China há aproximadamente 4 mil anos e inicialmente se baseou, fundamentalmente, no monocultivo de algas marinhas e carpas destinadas à alimentação humana. Devido ao seu alto potencial de desenvolvimento, esta atividade experimentou um crescimento surpreendente passando a se constituir, nas últimas décadas, numa importante fonte de renda para inúmeros países que a exploram (Arana, 1999).

Segundo Rana (1997), a aqüicultura pode ser definida 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. Entretanto, muitas são as definições atribuídas a esta atividade que, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), destina-se ao cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas, implicando ainda na intervenção do homem no processo de criação para aumentar a produção (FAO, 1990). Tomasso e Brune (1991) conceituam a aqüicultura num âmbito interdisciplinar, resultante da interação entre as ciências biológicas e a engenharia. Para Arana (1999), a aqüicultura é definida como uma atividade do homem, que exige um conhecimento específico e que resulta na produção abundante de organismos aquáticos

por caminhos diferentes aos da natureza. Pode-se ainda definir a aqüicultura de forma mais simplificada, referindo-se a ela como a arte de criar e multiplicar animais e plantas aquáticas (Aurélio, 1998).

Independente da definição adotada, a importância desta atividade é inegável, principalmente quando se considera o crescente aumento demográfico e, conseqüentemente, o desafio de alimentar um enorme contingente de pessoas sem depredar ainda mais o meio ambiente. A idéia de que os oceanos constituem fontes inesgotáveis de proteína animal vem sendo substituída diante do fato de que algumas das maiores regiões pesqueiras do mundo encontram-se hoje ameaçadas, com cerca de 70% dos seus estoques já extinto ou em vias de extinção. Segundo Edward Loayza, oficial de pesca do Banco Mundial no final da década de 90, "estamos nos dirigindo para o desastre de mais um recurso renovável" (Arana, 1999). Os mares do mundo estão sendo seriamente sobrepescados. Assim, novas alternativas devem ser estimuladas, visando atender as necessidades do homem do mundo moderno.

O potencial que a aqüicultura possui para atender estas questões fica evidente quando se observa o rápido crescimento médio do setor (9,2%/ano) em relação a outras atividades, como a criação de gado (2,8%/ano) e a pesca por captura (1,4%/ano). Durante o período de 1998-1999 a aqüicultura mundial cresceu cerca de 10%, apresentando nos anos seguintes (1999-2000 e 2000-2001) um crescimento médio equivalente a 6% ao ano (Borghetti *et al.*, 2003). Segundo a FAO (1990), espera-se que a aqüicultura contribua significativamente para diminuir a fome humana no planeta, já que

esta, juntamente com a pesca, é considerada pela Organização das Nações Unidas (ONU) uma atividade estratégica para assegurar o desenvolvimento sustentável, capaz de alimentar e gerar empregos.

A aqüicultura representa hoje um recurso de importância significativa para o estabelecimento de padrões sócio-ecológicos mais equilibrados, uma vez que, como qualquer outra atividade de produção, encontra-se intimamente relacionada a aspectos sociais, econômicos e ambientais (Vieira, 1991). Entretanto, dependendo da concepção adotada, a aqüicultura pode concentrar riquezas para uma minoria, sem preservar o meio ambiente e/ou promover o desenvolvimento social. Para consolidar a atividade como justa e sustentável é preciso considerar tanto a produção lucrativa quanto a preservação ambiental e o desenvolvimento social. Desta forma, a aqüicultura poderá ser encarada não como uma atividade efêmera, como ocorreu no passado, mas sim como uma atividade rentável e perene, capaz de promover o desenvolvimento social e econômico, uma vez que possibilita o aproveitamento efetivo dos recursos naturais, gerando riquezas e melhorias na qualidade de vida de populações locais (Valenti, 2000).

Apesar de viável, quando comparada com a pesca extrativista, a atividade de produção de organismos aquáticos consiste em um processo complexo e, embora, seja impossível produzir sem provocar impactos ambientais, deve-se procurar minimizar os seus efeitos, visando a manutenção da biodiversidade e dos recursos naturais sem alterar significativamente a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas. A simples criação dos organismos não é suficiente. Os ecossistemas devem permanecer equilibrados

para possibilitar a manutenção da atividade (Valenti, 2000). Para tanto, é necessário estabelecer estratégias de desenvolvimento, considerando tanto a sociedade que a sustenta, quanto o ambiente no qual encontra-se inserida (Arana, 1999).

Do total de organismos aquáticos produzidos anualmente através da aqüicultura mundial, cerca de 50% é de água salgada, 45% de água doce e 5% de água salobra. Entretanto, a produção de organismos marinhos ainda é muito baixa em relação à pesca extrativista. Das 142 milhões de toneladas (ton) de organismos marinhos produzidos no mundo menos que 50% é cultivado, sendo o restante proveniente de captura (Borghetti *et al.*, 2003). Os peixes constituem o principal grupo de organismos aquáticos cultivados, correspondendo a mais de 50% da produtividade mundial. Os crustáceos, apesar de contribuírem com apenas 4,2% do volume total de produção, ocupam lugar de destaque no que se refere ao valor de mercado, atingindo 16,5% do valor total gerado com a atividade (Brandini *et al.*, 2000).

Segundo Arana (1999), a maricultura, atividade que se destina ao cultivo de organismos marinhos, é o setor da aqüicultura que apresenta hoje a maior possibilidade de desenvolvimento a longo prazo e em grande escala. Ela constitui uma importante alternativa para atender a demanda comercial e a preservação de estoques naturais para as gerações futuras (Brandini *et al.*, 2000), principalmente para o Brasil, uma vez que a maioria dos estoques naturais de peixes, crustáceos e moluscos capturados ao longo da costa brasileira encontra-se em plena fase de sobrepesca (Paiva, 1997).

Dentro da maricultura, o cultivo de camarão vem se firmando como um dos segmentos que mais tem se desenvolvido, alcançando uma produção mundial superior a 1 milhão de ton/ano, gerando cerca de 6 bilhões de dólares, correspondentes a 12% do valor total da indústria de cultivo (ABCC, 2002). Dados de produção, relativos ao crescimento da aquicultura brasileira, têm revelado um avanço extraordinário para a atividade de cultivo de camarões que, na última década, apresentou um crescimento espantoso, passando das 2 mil toneladas produzidas em 1990 para 36 mil toneladas durante o ano de 2001, demonstrando a sua alta capacidade de desenvolvimento (Borghetti *et al.*, 2003; Rocha e Rodrigues, 2003).

Atualmente existem no Brasil, aproximadamente, 35 laboratórios de produção de pós-larvas e mais de 600 fazendas de engorda de camarão localizados, em sua grande maioria, na região nordeste do país (tabela 1). Estima-se que mais de 90% dos centros produtivos utilizem a espécie *Litopenaeus vannamei* (ABCC, 2002).

Tabela 1: Distribuição das fazendas de engorda e laboratórios de produção de pós-larvas de camarões marinhos existentes no Brasil.

Fazendas de Cultivo			Laboratórios de Larvicultura	
Nº de fazendas	localização	Área de cultivo (ha)	Nº de laboratórios	Produção de PLs
36	Bahia	1710	08	2 milhões
74	Pernambuco	1031	03	2 milhões
50	Paraíba	582	02	400 mil
280	Rio Grande do Norte	3591	11	6 milhões e 700 mil
126	Ceará	2.260	05	4 milhões
12	Piauí	590	04	600 mil
10	Espírito Santo	97	01	100 mil
41	Santa Catarina	560	01	-
03	Pará	22	-	-
02	Alagoas	16	-	-
05	Maranhão	155	-	-
40	Sergipe	352	-	-
01	Paraná	50	-	-

2.2. A Espécie *Litopenaeus vannamei*

2.2.1. Taxonomia e Morfologia

O camarão marinho *Litopenaeus vannamei* pode ser classificado taxonomicamente da seguinte forma:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea **Pennant, 1777**

Classe Malacostraca **Latreille, 1806**

Subclasse Eumalacostraca **Grobben, 1892**

Superordem Eucarida **Calman, 1904**

Ordem Decapoda **Latreille, 1803**

Subordem Dendobranchiata **Bate, 1888**

Superfamília Penaeoidea **Rafinesque, 1815**

Família Penaeidae **Rafinesque, 1815**

Subfamília Penaeinae **Dana, 1852**

Gênero *Penaeus* **Fabricius, 1798**

*Litopenaeus*¹ **Pérez Farfante e Kensley, 1997**

Espécie *Litopenaeus vannamei* **Boone, 1931**

¹Segundo recente revisão taxonômica realizada por Pérez-Farfante e Kensley (1997).

Os animais pertencentes ao filo Arthropoda (gr. *artros*, articulação; *podos*, pé) se caracterizam pela presença de um exoesqueleto e, principalmente, de apêndices articulados. Dentre os diferentes tipos de artrópodos podemos encontrar insetos, aranhas e camarões. Os camarões, pertencentes ao grupo dos Crustacea (lat. *crusta*, carapaça dura), são animais predominantemente aquáticos, portadores de exoesqueleto calcário e cabeça e tórax fundidos numa estrutura denominada cefalotórax. Eles apresentam apêndices com dois ramos (birremes) e dois pares de antenas que os diferenciam dos demais artrópodos (Narchi, 1973). Segundo Bowman e Abele (1982), existem cerca de 38.000 espécies de crustáceos, sendo que, aproximadamente, 8.500 pertencem à ordem Decapoda (gr. *deca*, dez; *podos*, pé), que inclui os crustáceos mais altamente organizados, como, por exemplo, as lagostas e os caranguejos.

A diferença básica entre os diversos tipos de decápodas se baseia na maneira pela qual ocorre a fecundação. Os ovos podem ser incubados no abdome das fêmeas (nas cerdas pleopodiais) ou liberados diretamente na água. Neste último caso, os animais são classificados como pertencentes à subordem Dendobranchiata, que inclui os decápodas pertencentes à família Penaeidae, composta por cinco subfamílias, entre estas a Penaeinae (Pinheiro e Hebling, 1998).

A subfamília Penaeinae possui cerca de 15 gêneros, porém, uma classificação mais recente subdividiu o gênero *Penaeus* em cinco novos gêneros (*Litopenaeus*, *Marsupenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus* e *Melicertus*), com base em características morfológicas e biogeográficas

(tabela 2) (Burukovskii, 1985; Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Entretanto, a idéia que, de fato, estas espécies sejam genericamente diferentes tem sido questionada, o que tem levado alguns autores à adoção do termo subgênero, e não gênero, para a nova classificação adotada (Baldwin *et al.*, 1998; Gusmão, 2001).

Tabela 2: Classificação taxonômica atribuída às diversas espécies de camarões marinhos pertencentes ao gênero *Penaeus*, após revisão realizada por Pérez-Farfante e kensley (1997).

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

O corpo dos camarões se caracteriza por apresentar uma carapaça externa e rígida (exoesqueleto). Este revestimento cuticular recobre toda a sua extensão e é formado a partir da secreção e deposição de quitina (polissacarídeo) e materiais calcários, principalmente, o carbonato de cálcio. Para que ocorra o crescimento corpóreo do animal é necessário que o seu exoesqueleto seja rompido. Este fenômeno, conhecido como muda, envolve uma série de mecanismos morfofisiológicos que possibilitam a ruptura e perda do antigo exoesqueleto. A muda ou ecdise ocorre sucessivas vezes durante o ciclo de desenvolvimento dos camarões, sendo mais comumente observada nos estágios larval e juvenil. Ela se inicia a partir da separação entre a cutícula e a epiderme do animal (apólise) e finaliza quando diversas rupturas ocorrem ao longo de suturas existentes na região dorsal e, de fato, o animal consegue se libertar do seu antigo exoesqueleto (Pinheiro e Hebling, 1998).

Além da presença de uma carapaça e de apêndices articulados, o corpo dos camarões é composto por uma série de segmentos (somitos) cefálicos e torácicos fundidos, originando uma estrutura denominada cefalotórax. É no cefalotórax que se localizam os olhos, rostró, antenas e o primeiro conjunto de apêndices, denominados pereiópodos. No abdome, os seis somitos presentes não sofrem processo de fusão, podendo ser visualizados durante toda a fase adulta do animal. Os pleópodos (segundo conjunto de apêndices) e os urópodos estão localizados na porção abdominal do camarão. O abdome é bem desenvolvido e possui em sua região terminal uma estrutura mais rígida, denominada telso. Os camarões possuem corpo alongado, lateralmente comprimido, especialmente, na região posterior do

animal (figura 1). Eles são excelentes nadadores, principalmente, devido a movimentos rítmicos realizados pelos pleópodos. A contração violenta da porção terminal do abdome, auxiliada por um leque caudal, formado pelos urópodos e telso, possibilita a esses animais um rápido deslocamento dianteiro. Eles nadam intermitentemente, são considerados organismos detritívoros e cavadores de fundo mole. Vivem entre algas e gramíneas marinhas, debaixo de pedras e conchas e apresentam o seu padrão de atividades controlado pela luz e/ou marés. Apesar da grande maioria dos camarões ser marinha, algumas espécies ocupam também ambientes de água doce (Narchi, 1973; Barnes, 1984; Pinheiro e Hebling, 1998).

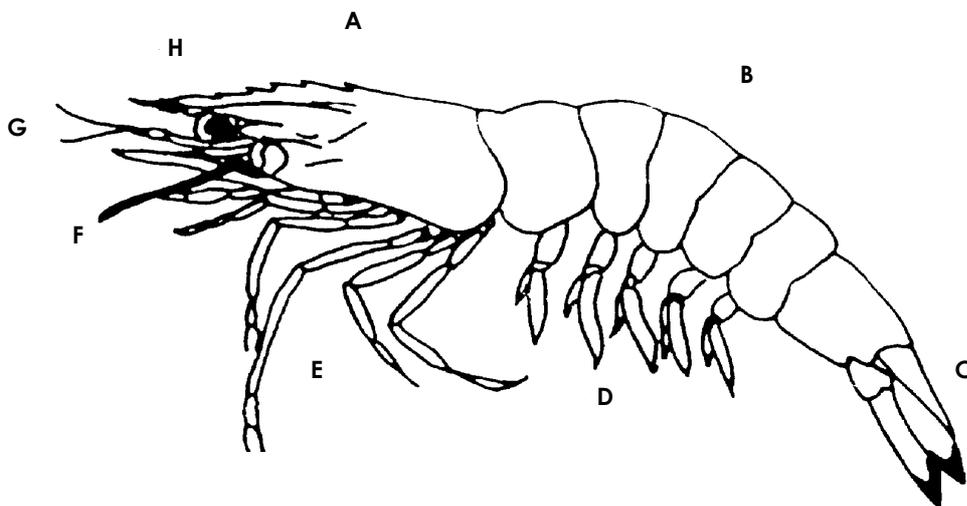


Figura 1: Esquema representativo da morfologia externa do camarão marinho (retirado de Burukovskii, 1985), ilustrando a região do cefalotórax (A); a região abdominal com os somitos individualizados (B); a extremidade caudal em forma de leque, constituída pelo telso e urópodos (C); os pleópodos (D); os pereiópodos (E); as antenas (F); as antênulas (G) e o rostro serrilhado, composto por nove dentes (H).

Além da natação, os pleópodos apresentam papel fundamental na reprodução, uma vez que, nos machos, o primeiro par de pleópodos dá origem ao órgão copulador, denominado petasma. Os pereiópodos são apêndices maiores e mais delgados e, apesar de possuírem função locomotora, raramente são empregados com esta finalidade. A presença de quelas nas extremidades dos primeiros pares de pereiópodos faz com que estes apêndices sejam mais comumente utilizados para alimentação e defesa do animal. Além desta função, os pereiópodos também podem auxiliar na desova das fêmeas durante o processo de reprodução. No cefalotórax se localizam o "cerébro", o "coração", o hepatopâncreas, o estômago e as gônadas. No abdome estão o intestino, o ânus e um cordão nervoso que se estende por todo o corpo do animal (Narchi, 1973; Pinheiro e Hebling, 1998). A tabela 3 descreve de forma sumarizada a localização e as principais funções de algumas das estruturas aqui mencionadas.

Tabela 3: Descrição da localização e função de algumas principais estruturas que compõem o corpo dos camarões.

Cefalotórax		Abdome	
(composto pela fusão de seis somitos cefálicos e oito torácicos)		(ausência de fusão entre os seis somitos presentes)	
Estrutura	Função	Estrutura	Função
1º par de antenas (Antênulas)	táctil, olfativa e de equilíbrio	1º par de pleópodo	natação
2º par de Antenas	táctil	2º par de pleópodo	natação e reprodução
1º par de pereiópodo	apreensão de alimento	3º par de pleópodo	natação
2º par de pereiópodo	alimentação, defesa e reprodução	4º par de pleópodo	natação
3º par de pereiópodo	locomoção	5º par de pleópodo	natação
4º par de pereiópodo	locomoção	urópodos	direcionamento durante a natação
5º par de pereiópodo	locomoção		
gânglio cerebóide	centro nervoso		
hepatopâncreas	excreção, filtração e reabsorção		

2.2.2. Distribuição e Reprodução

As espécies de camarões peneídeos apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontradas nos oceanos Atlântico, Índico/Pacífico e Mediterrâneo. No Brasil, podemos encontrar quatro espécies de camarões peneídeos: *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. A espécie *L. vannamei* não ocorre na costa brasileira, ela é restrita ao Oceano Pacífico e sua distribuição natural vai do México (Província de Sonora) até o Perú (Sul de Tumbes) (Benzie, 2000; Gusmão, 2001).

Os camarões peneídeos apresentam um ciclo de vida relativamente complexo, envolvendo migrações e uma série de estágios larvais. Os ovos são extremamente pequenos e em grande quantidade e o número de etapas larvais é maior quando comparado com espécies dulcícolas (D'Incao, 1991; Albertoni, 1999). Na natureza, o ciclo de desenvolvimento do camarão marinho se inicia com a maturação, o acasalamento e a desova em águas oceânicas de altas profundidades (40 a 100 m). Após a desova, os ovos eclodem, dando origem aos náuplios, minúsculas larvas planctônicas que se alimentam exclusivamente de vitelo. Posteriormente, surgem o segundo e terceiro estágios larvais, denominados, respectivamente, zoea e misis. Estas larvas, também planctônicas, se alimentam de fitoplâncton, quando zoea, e de zooplâncton, quando misis. Cada um dos estágios larvais apresenta uma série de subestágios caracterizados por sucessivas mudanças morfológicas (náuplios com seis

subestágios, zoea com três subestágios e misis com três subestágios). Por volta do 20º dia após a eclosão do ovo surgem as pós-larvas (PLs) que também apresentam uma série de subestágios (de 22 a 24). As primeiras PLs se desenvolvem em águas oceânicas e por volta do sexto subestágio migram para regiões costeiras de baixa salinidade, assumindo hábitos bentônicos e se alimentando de matéria orgânica em decomposição. Próximos à maturidade sexual, os camarões começam a retornar às águas oceânicas de maior salinidade, reiniciando o seu ciclo reprodutivo (figura 2) (Valentini *et al.*, 1991; Arana, 1999). O desenvolvimento larval pode durar cerca de 50 dias. O desenvolvimento juvenil e pré-adulto ocorre em regiões estuarinas com salinidade moderada e dura um período de aproximadamente quatro meses (D'Incao, 1984).

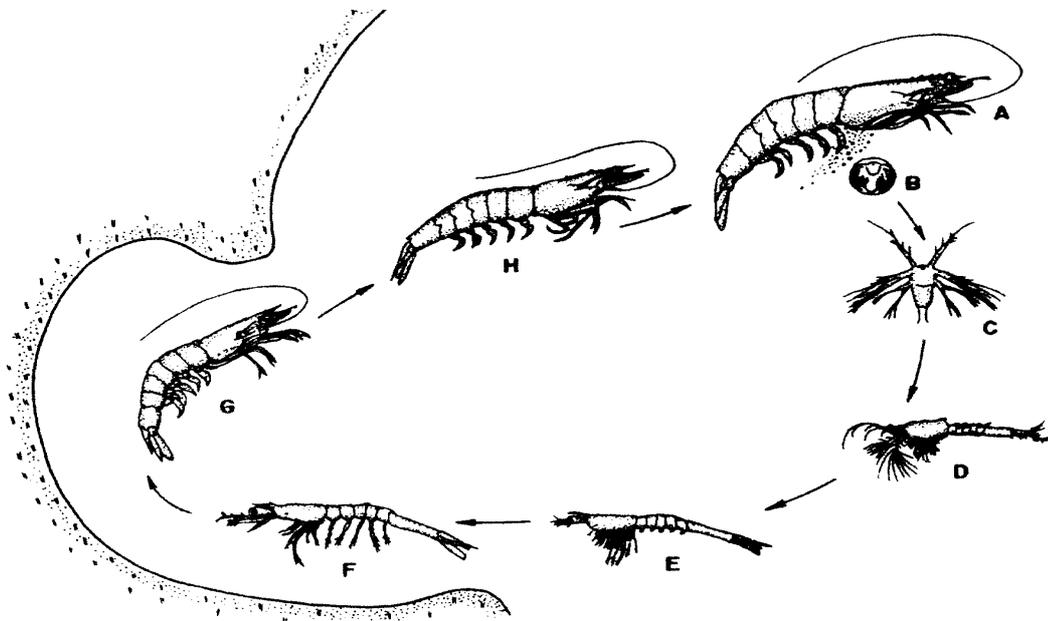


Figura 2: Ciclo reprodutivo exemplificando as principais etapas de desenvolvimento do camarão marinho: reprodutor desovando (A), ovo (B), náuplio (C), zoea (D), misis (E), pós-larva (F), juvenil (G) e adulto (H).

2.2.3. Importância Econômica

Os camarões constituem uma importante fonte alternativa de proteína extremamente apreciada pelo homem, alcançando elevados preços no mercado e estimulando o desenvolvimento de centros produtivos em diversas partes do mundo (Nascimento *et al.*, 1995). Os peneídeos são considerados os camarões marinhos comercialmente mais importantes. Sua pesca extrativista é realizada com rede de arrasto, uma rede muito longa em forma de "V", que é rebocada atrás do barco. Além de camarões, esta rede costuma arrastar consigo uma quantidade muito grande de outros organismos, chamados de "lixo" pelos pescadores de camarão (Holthius, 1980; Barnes, 1984). No início dos anos 80, a quantidade total de fauna descartada foi estimada em torno de 3 a 5 milhões de toneladas. Uma maneira de minimizar estas perdas foi tentar o aproveitamento destes organismos. Entretanto, a maior parte da fauna acompanhante apresenta pequeno valor econômico e, na maioria das vezes, é composta por espécies raras de baixa densidade populacional, ocasionando a extinção destas e a conseqüente regressão nos sistemas bentônicos (Nascimento *et al.*, 1995).

Como alternativa para a produção pesqueira, o cultivo de camarões marinhos tem se mostrado bastante eficiente, principalmente, quando se considera a relação de área de distribuição de uma espécie e a quantidade de indivíduos nela capturada. Em média a produtividade mundial de camarões cultivados ultrapassa 1 ton/ha/ano, sendo extremamente alta

quando comparada com a área natural que uma espécie necessita para se reproduzir (Nascimento *et al.*, 1995).

Em 1996, a produção mundial de peneídeos foi estimada em torno de 2,8 milhões de toneladas, sendo que somente 25% do total de camarões produzidos foram provenientes da atividade de cultivo. Dados mais recentes demonstram que, durante o ano 2000, o volume total de produção ultrapassou as 4 milhões de toneladas. O setor de captura contribui com cerca de 3 milhões, enquanto que pouco mais de 1 milhão de toneladas foram produzidas através da atividade de cultivo. Segundo a Aliança Global de Aqüicultura (GAA), a produção de camarão cultivado corresponde hoje a mais de 1,2 milhões, devendo ultrapassar em 2005 a casa das 2 milhões de toneladas (Rocha, 2002; Borghetti *et al.*, 2003).

A espécie *P. monodon* é a responsável pelo maior volume de produção, sendo seguida, respectivamente, pelas espécies *Fenneropenaeus chinensis* e *L. vannamei* (Borghetti *et al.*, 2003). Apesar do camarão Tigre *P. monodon* dominar a produção mundial, correspondendo a cerca de 65% do total de camarões produzidos, a espécie *L. vannamei* é considerada o camarão marinho mais importante no Hemisfério Ocidental, tendo grande aceitação nos mercados americano e europeu. Esta espécie, considerada de porte médio, apresenta um desempenho reprodutivo em laboratório superior à *P. monodon* (o qual apresenta dificuldades técnicas de manejo), possuindo taxa de crescimento uniforme e fácil adaptabilidade a diferentes condições ambientais (Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado, 2001).

2.3. O Cultivo de Camarão Marinho

2.3.1. Histórico

O cultivo de camarão marinho teve seu início na Ásia, onde por muitos séculos os fazendeiros colhiam safras provenientes de viveiros abastecidos por marés. O cultivo moderno, tal qual como o conhecemos, surgiu na década de 30, quando cientistas japoneses iniciaram trabalhos de larvicultura com o camarão *Marsupenaeus japonicus*, obtendo as primeiras pós-larvas produzidas em laboratório (Arana, 1999). Entretanto, foi somente nas décadas de 70 e 80 que a atividade começou a crescer. A partir daí, pescadores e larvicultores começaram a abastecer seus tanques com grandes quantidades de juvenis (Rosenberry, 1994).

Atualmente, a atividade de cultivo de camarões se encontra difundida em mais de 50 países, sendo a Tailândia o maior produtor de camarão cultivado do mundo e o Brasil o da América do Sul. Os EUA, a Europa Ocidental e o Japão são os principais consumidores e, apesar de possuírem produção intensiva e alta tecnologia, apresentam ainda um volume de produção relativamente baixo (Rosenberry, 1994; Rocha e Rodrigues, 2003).

No Brasil, o cultivo de camarão marinho surgiu na década de 70 com a criação da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) e foi inicialmente suportado pelo cultivo das espécies *F. brasiliensis* e *M. japonicus*. Nesta mesma época, o governo do estado do Rio Grande do Norte criou o Projeto Camarão, incentivando o cultivo de camarão em regiões de antigas salinas, as quais encontravam-se desativadas devido a grande crise

enfrentada pela atividade de extração de sal naquele estado (Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado, 2001).

Na primeira metade dos anos 80, um programa de incentivo ao cultivo de camarões marinhos possibilitou o desenvolvimento de várias empresas camaroneiras. Projetos pioneiros, subsidiados pelo governo, investiram cerca de 22 milhões de dólares na atividade. Entretanto, problemas políticos e econômicos, falta de tecnologia e a fragilidade das espécies cultivadas, dificultaram, na época, o crescimento desse setor (Guerrelhas, 1997; Wainberg e Câmara, 1998). Com o surgimento da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) em 1984 e a introdução da espécie exótica *L. vannamei*, a carcinicultura brasileira retomou o seu crescimento, experimentando um sensível avanço financeiro e tecnológico (Wainberg e Câmara, 1998; Andreatta, 1998). Entretanto, apesar da excelente performance desta espécie nas condições de cativeiro do Brasil, o seu cultivo limitou-se, durante algum tempo, somente ao estado da Bahia. Os demais estados continuaram a cultivar apenas espécies nativas. Naquela época, mais de 70% do total de pós-larvas produzidas no país correspondiam às espécies *F. subtilis* e *F. schmitti* e menos de 30% à espécie *L. vannamei* (Wainberg e Câmara, 1998).

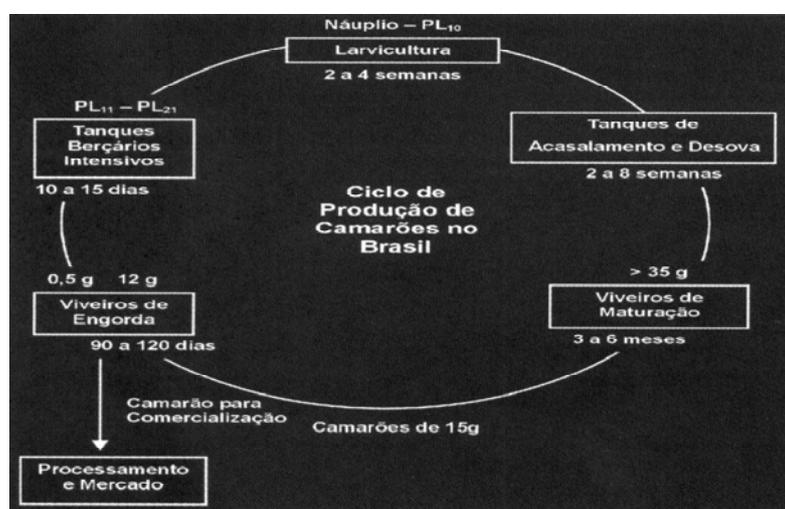
Durante mais de dez anos, o Brasil importou náuplios, pós-larvas e reprodutores de *L. vannamei* de países localizados na costa do Pacífico, como Equador, Panamá, México e EUA (Hawaii). Somente em 1992, os primeiros adultos de *L. vannamei* produzidos no Brasil foram utilizados como reprodutores e a espécie pôde ser introduzida em diversos estados do país. A partir de

então, pequenos e médios produtores puderam abastecer os seus tanques com larvas de *L. vannamei* (Guerrelhas, 1997). O surgimento de laboratórios de produção de pós-larvas e a implantação de novas rações balanceadas propiciaram o sucesso da nova espécie cultivada (Andreatta, 1998).

2.3.2. Manejo em Cativoiro

Segundo Arana (1999), a carcinicultura marinha refere-se à produção de camarões marinhos mediante técnicas de aquicultura, ou seja, criação desses organismos sob condições controladas, em geral, tanques de terra que podem variar de 0,1 a 100 hectares, construídos em ambiente natural. Seu cultivo se baseia exatamente no ciclo de vida que ocorre na natureza, respeitando tanto as necessidades nutricionais, quanto as ambientais (temperatura, salinidade, pH, etc). Ele compreende basicamente duas fases: a larvicultura; responsável pela produção de larvas, e a engorda; responsável pelo crescimento do camarão até a idade comercial (figura 3).

Figura 3: Esquema representativo do processo de produção de camarões marinhos (retirado de Nunes, 2001), evidenciando as fases de maturação, larvicultura, processamento e comercialização.



A larvicultura é realizada em laboratórios especializados e se inicia a partir da obtenção dos reprodutores, que podem ser capturados diretamente na natureza (mar aberto, baías, lagoas costeiras) ou, no caso de espécies exóticas, obtidos através de importação. Ela é subdividida em dois diferentes setores: a maturação e o berçário. A maturação é o setor responsável pelo acasalamento e desova. Em geral, machos e fêmeas são mantidos juntos, em tanques apropriados, até que ocorra o acasalamento. Após o acasalamento, as fêmeas ovadas são transferidas para os tanques de desova, retornando, posteriormente, aos tanques de maturação. Um recurso comumente praticado para promover a maturação nas fêmeas e um maior número de desovas é a ablação, que consiste na retirada de um dos pedúnculos oculares que contém glândulas relacionadas com a reprodução. Uma fêmea ablada pode produzir até 300 mil ovos por desova e maturar até cerca de 4 vezes ao mês (Arana, 1999; Bezerra, comunicação pessoal).

Os náuplios recém eclodidos vão para o berçário, permanecendo neste setor até atingirem o estágio de pós-larva. Em geral, é nesta fase que os camarões são transportados para as fazendas de engorda e liberados em tanques de terra, ficando nos viveiros por aproximadamente três meses, até alcançarem o peso ideal para a comercialização que, em geral, se encontra por volta de 12g (Paiva e Arrais, 1997).

De acordo com a densidade do tanque de engorda e do tipo de alimentação que é fornecido, o cultivo de camarões pode ser classificado em três sistemas principais: extensivo (1 a 4 camarões/m², com alimento natural), semi-intensivo (5 a 30 camarões/m², com alimento natural e suplementar) e

intensivo (30 a 120 camarões/m², com alimento consistindo exclusivamente em ração balanceada). Os sistemas extensivo e semi-intensivo costumam ser os mais amplamente difundidos entre os países do terceiro mundo (Arana, 1999).

No Brasil, a produtividade média de camarões cultivados encontra-se próxima a 5,5/ton/ha/ano, decorrente de cultivos semi-intensivo e intensivo. A facilidade de cultivo da espécie *L. vannamei*, juntamente com as condições climáticas e topográficas favoráveis e o grande potencial que o país apresenta (8.000 km de costa) têm despertado o interesse de um número cada vez maior de investidores, que vislumbram na atividade um importante meio gerador de riquezas (Paiva e Arrais, 1997; Nunes, 2001; Rocha e Rodrigues, 2003).

Nos últimos anos, a área total destinada ao cultivo de camarão marinho experimentou um crescimento significativo (165% de 1996 a 1998 e 55% de 1998 a 1999), tendo como principal consequência o aumento na produtividade que, atualmente coloca o Brasil em primeiro lugar dentro do *ranking* mundial. Segundo a ABCC, o país superou a casa das 60 mil toneladas de camarões cultivados, produzindo cerca de 16 bilhões de pós-larvas durante o ano de 2003 (ABCC, 2002; Rocha e Rodrigues, 2003).

2.3.3. Desenvolvimento Sustentável

As técnicas de produção de camarões marinhos, apesar de extremamente eficientes, sob o ponto de vista econômico, podem ocasionar um dos maiores impactos ambientais, se utilizadas de maneira inadequada,

constituindo-se num importante fator de poluição ambiental (Rosenthal, 1994; Currie, 1994; Wilks, 1995; Pillay, 1996). O fornecimento de alimento em excesso é considerado o maior causador da deteriorização do meio ambiente (Boyd, 1992). O alimento não consumido pelos camarões, juntamente com as fezes, resulta no acúmulo de matéria orgânica. Os excrementos e as mudas dos camarões, somados à matéria orgânica em decomposição, favorecem a produção de fitoplâncton e conseqüentemente a eutrofização do ambiente. O excesso de O₂ dissolvido na água durante o dia, em decorrência da atividade de fotossíntese do fitoplâncton, e o esgotamento deste durante a noite, devido à respiração dos organismos cultivados, além de ocasionar a mortalidade destes, diminui a qualidade da água dos tanques de cultivo. Os efluentes despejados no ambiente externo propiciam o desequilíbrio no ecossistema entorno, tornando inviável o desenvolvimento e a manutenção da atividade, já que esta depende diretamente dos recursos naturais existentes (Wang, 1990; Arana, 1999; Valenti, 2000).

Apesar disso, os impactos ambientais, eventualmente, promovidos pela carcinicultura são localizados e identificáveis e as possibilidades técnicas de mitigação, ou mesmo eliminação, são uma realidade, diferente do que ocorre na pesca extrativista (Nascimento *et al.*, 1995). A indústria camaroneira é uma atividade que necessita de condições hidrobiológicas favoráveis, estando diretamente relacionada com a preservação do meio ambiente e sendo, portanto, compatível com qualquer programa de preservação ambiental. Para tanto, é necessário que haja uma preocupação constante com a preservação dos recursos naturais. A aeração dos viveiros, a diminuição

de suprimento alimentar e o tratamento prévio dos efluentes devem ser estratégias utilizadas para promover a sustentabilidade da carcinicultura e da aqüicultura como um todo (Wang, 1990; Valenti, 2000).

Outro fator, de importância significativa para assegurar a sustentabilidade da atividade, diz respeito à saúde genética dos indivíduos cultivados. Em longo prazo, o cultivo de camarões pode trazer conseqüências indesejáveis sob o ponto de vista genético. A maior incidência de indivíduos anões na despesca, por exemplo, é resultado de uma possível perda de variação genética nos estoques cultivados (Benzie *et al.*, 1992; Benzie *et al.*, 1993). O efeito de "gargalo", promovido pelo número reduzido de reprodutores utilizados no cultivo, em decorrência da alta fecundidade, pode conduzir a uma diminuição da variabilidade genética e à redução de alelos raros em diferentes locos gênicos (Perez e Romero, 1991). Adicionalmente, o cruzamento consangüíneo também contribui com a perda progressiva da variabilidade genética total do estoque, tendo como conseqüências a diminuição do tamanho médio dos indivíduos e o desenvolvimento embrionário incompleto (Hedgecock *et al.*, 1976; Alonso *et al.*, 1987; Espinosa *et al.*, 1989; Sunden e Davis, 1991).

O uso contínuo de matrizes provindas de cativeiro, apesar de possibilitar a independência de reprodutores selvagens e uma melhor adaptação às condições locais de cultivo, pode contribuir com a perda de qualidades genéticas, caso o manejo utilizado não seja apropriado. Segundo a Aliança Global de Aqüicultura, a utilização de técnicas de cruzamento seletivo associadas a ferramentas da biologia molecular constitui hoje um

importante instrumento para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético que possibilitem a melhoria e manutenção de características de interesse econômico em linhagens cultivadas (Plataforma Tecnológica do Camarão Cultivado, 2001; Preston e Cliford, 2002).

Recentemente, um código de conduta para o desenvolvimento da carcinicultura brasileira estabeleceu as premissas básicas para o ordenamento técnico, econômico e ambiental da atividade para que esta se mantenha coesa em relação a aspectos que vão desde a sustentabilidade ambiental até a qualidade do produto final (Rocha e Rodrigues, 2003). Estratégias de práticas ambientais e socialmente responsáveis, visando a orientação adequada do setor, foram estabelecidas. Dentre estas estão o desenvolvimento científico de tecnologias relacionadas ao manejo e, principalmente, à genética, incluindo estudos de variação e de sanidade e programas de seleção (Plataforma Tecnológica do Camarão Cultivado, 2001).

2.4. Estudos Genéticos na Aqüicultura

2.4.1. Aplicação e Potencialidades

O potencial de aplicação que a genética e a biotecnologia apresenta para promover melhorias na atividade de cultivo é bastante promissor e vai desde a seleção de linhagens e produção de indivíduos híbridos, poliplóides e monossexuais, até o desenvolvimento de animais transgênicos, via modernas técnicas da engenharia genética. Existe hoje uma infinidade de processos metodológicos que podem ser utilizados para garantir

o aumento de produtividade em organismos cultivados. Indivíduos híbridos, por exemplo, podem reunir características vantajosas de duas ou mais espécies. A produção de triplóides estéreis e tetraplóides pode produzir animais maiores, que apresentem altas taxas de crescimento (Perez e Romero, 1991). Em ostras, a ausência de tecido reprodutor em animais triplóides, durante um período de tempo relativamente maior, resultou num produto de mercado mais apreciado pelo consumidor, aumentando o seu valor econômico. Na espécie *Crassostrea gigas*, animais triplóides promoveram um aumento de 50% na produção total de ostras do Pacífico (para revisão ver Colwell, 1995).

Em camarões, estes estudos também têm se mostrado eficientes. Neofêmeas da espécie *Macrobrachium rosenbergii*, originadas a partir de machos revertidos, produziram linhagens monosexuais masculinas, quando cruzadas com machos normais, demonstrando a eficiência da biotecnologia na reversão sexual em crustáceos (Sagi e Cohen, 1990). Em *F. chinensis*, indivíduos tetraplóides apresentaram um crescimento 20% maior que indivíduos diplóides (Xiang *et al.*, 1992). Populações híbridas de *L. setiferus* com *L. schmitti* (Bray *et al.*, 1990), de *P. monodon* com *F. penicillatus* (Lin *et al.*, 1988) e de *L. setiferus* com *L. stylirostris* (Lawrence *et al.*, 1984) foram desenvolvidas através de técnicas de inseminação artificial. Entretanto, estes estudos são ainda relativamente escassos e muito pouco se conhece sobre a estrutura e comportamento cromossômico da maioria das espécies de camarões. Análises mais abrangentes permitirão o estabelecimento de programas de hibridação interespecífica, assim como a obtenção de indivíduos poliplóides, para um maior número de espécies (Perez e Romero, 1991).

O desenvolvimento de linhagens transgênicas também pode assegurar ganhos de produção. Em ostras, a adição de cópias do gene de hormônio de crescimento possibilitou um aumento significativo na taxa de crescimento desses animais (Paynter e Chen, 1991). Em salmão a transferência da proteína *anti-freeze*, presente no sangue de alguns peixes marinhos, expandiu a criação desta espécie para regiões com temperaturas mais baixas (Raymond *et al.*, 1989). A tecnologia de DNA recombinante vem sendo aplicada também para o desenvolvimento de vacinas eficazes (Manning e Leong, 1990). Apesar de doenças víróticas e bacterianas constituírem um dos principais problemas relacionados ao manejo de organismos aquáticos cultivados, felizmente, nas últimas décadas, o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas, através do emprego de modernas técnicas da biologia molecular, tem conferido uma maior imunidade às populações cativas (Fryer *et al.*, 1991). Em truta arco-íris, a identificação de um gene para resistência a um patógeno específico poderá auxiliar pesquisas que visem o desenvolvimento de linhagens de peixes mais resistentes (Leong e Munn, 1991).

Somado a esses avanços, uma das maiores contribuições da genética e biotecnologia aplicada à aqüicultura tem sido a identificação de marcadores moleculares, principalmente, para estudos de variabilidade genética em espécies economicamente importantes. Em grupos onde a variação genética é grande, como, por exemplo, o salmão do Pacífico, estes estudos, em especial o de alozimas, têm sido empregados para investigar a diferenciação de estoques (Altukhov e Salmenkova, 1987; Utter, 1991). Em espécies com pequena variabilidade genética, como o salmão do Atlântico

(Stahl, 1983), o salmão sockey (Wood *et al.*, 1989), as lagostas e os pitús (Shaklee, 1983), os estudos bioquímicos não são tão satisfatórios, devido principalmente à necessidade de grandes amostras para análise. Nestes casos, os métodos de detecção de variabilidade através da análise direta do DNA são mais eficientes, possibilitando a obtenção de um número indefinido de marcadores moleculares, utilizados nas mais diversas aplicações (Carvalho e Pitcher, 1995).

A identificação de marcadores de DNA pode estimar os níveis de variação genética, discriminar linhagens e/ou indivíduos e permitir o rápido diagnóstico de doenças, através do desenvolvimento de sondas e marcas de DNA específicas (Carvalho e Pitcher, 1995; Colwell, 1995). Em larvas de bacalhau, análises moleculares, baseadas no polimorfismo de seqüências VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), foram realizadas para determinar o grau de parentesco entre grupos de diversas famílias (Wright, 1993). Marcadores de VNTRs também têm sido utilizados em estudos de diversidade (Galvin *et al.*, 1995; Freitas e Galetti, 2002), melhoramento genético (Hillel *et al.*, 1990) e programas de reprodução (Rico *et al.*, 1991).

Em truta arco-iris a variação genética foi estudada através da utilização de marcadores microssatélites ou SSRs (*Sequence Short Repeats*) (Bentzen *et al.*, 1991). Seqüências de microssatélites têm se mostrado extremamente eficientes para demonstrar o emprego de marcas genéticas como ferramenta em programas de monitoramento genético de diferentes organismos cultivados como ostras (Naiciri *et al.*, 1995), peixes (Slettam, 1993) e camarões (Cruz *et al.*, 2002). Em carpas, a identificação de seqüências

microssatélites e de seqüências de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) possibilitou a determinação dos níveis de variabilidade e distância genética de diferentes estoques reprodutores cultivados na Hungria (Bártfai *et al.*, 2003). Populações da espécie *Cyprinus carpio* também foram analisadas através da identificação de marcadores de RAPD (Dong e Zhou, 1998). Na Índia, análises de RAPD se mostraram eficientes para caracterização genética de diferentes espécies de carpas (Barman *et al.*, 2003). A técnica de RAPD também tem sido utilizada com sucesso em análises filogenéticas (Comincini *et al.*, 1996), determinação de parasitas (Bhattacharrya *et al.*, 1993), identificação de subespécies (Bardakci e Skibinski, 1994) e de DNA *fingerprinting* (Bostock, *et al.*, 1993).

Independente do processo metodológico utilizado, o potencial que a genética apresenta para resolver problemas relacionados à atividade de cultivo de organismos aquáticos, sejam estes destinados à produção de proteína animal, à aquariofilia ou à reintrodução de fauna em programas de conservação, é inegável. As possibilidades de manipulação genética tornam factível a expressão de um caracter desejável em uma determinada população. Este caráter pode estar relacionado à capacidade de adaptação, a efeitos de coloração corpórea ou simplesmente ao ganho de peso em um menor espaço de tempo. As melhorias obtidas podem se dar a longo ou curto termo. Em geral, processos que possibilitam ganhos mais imediatos, costumam ser mais efêmeros e não cumulativos. Assim, um conjunto de prioridades para desenvolvimento de programas de manejo adequados, com base nas diferentes estratégias utilizadas, tais como cruzamentos intra- e

inter-específicos, programas de cruzamento seletivo e monitoramento da variabilidade genética, deve ser estabelecido (Galetti e Freitas 1999; Arai, 2001; Hew e Fletcher, 2001).

2.4.2. Marcadores Moleculares

Durante a década de 90, grandes avanços foram alcançados através do desenvolvimento de inúmeras técnicas da biologia molecular, as quais possibilitaram a utilização de uma infinidade de procedimentos metodológicos aplicados a estudos genético-populacionais. Estas inovações permitiram a produção de dados altamente informativos, de grande acuracidade, promovendo uma verdadeira revolução na genética clássica (Snnucks, 2000; Matioli e Passos-Bueno, 2001).

Dentre as diversas descobertas tecnológicas estão o desenvolvimento e identificação de diferentes classes de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares constituem todo e qualquer fenótipo molecular decorrente de regiões do genoma expressas ou não. Muitas vezes, a função e seqüência de nucleotídeos dessas regiões são desconhecidas. Um marcador molecular pode ainda constituir-se marcador genético em populações segregantes, apresentando um comportamento tipicamente mendeliano. O desenvolvimento da técnica de amplificação em cadeia de segmentos do DNA, utilizando a DNA Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR), desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, tem possibilitado a

descrição de classes de marcadores específicos, permitindo uma análise direta da variação genética (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Snnucks, 2000).

A reação de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA Polimerase. Baseada no anelamento e extensão enzimática de pequenas moléculas de DNA de fita simples (oligonucleotídeos), utilizadas como *primers*, a reação delimita a seqüência específica de DNA de fita dupla que deverá ser amplificada. Os *primers* são sintetizados de modo a se complementarem às seqüências flanqueadoras da região alvo. A técnica de PCR, juntamente com as técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA, tem possibilitado a descrição da estrutura do genoma de diversas espécies (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

O genoma dos eucariotos é composto por seqüências de DNA altamente repetidas, medianamente repetidas e seqüências que aparecem uma única ou poucas vezes. As seqüências repetidas apresentam-se dispersas no genoma ou agrupadas lado a lado, constituindo as chamadas repetições em *tandem*. Repetições em *tandem* podem ainda estar esparsas, variando o número de unidades de repetições. Por este motivo, estas seqüências são conhecidas como repetições em *tandem* em número variado ou, simplesmente, VNTRs (Alberts *et al.*, 1990). Por variarem o número de repetições, as VNTRs produzem um padrão espécie-específico que serve para caracterização de diferentes indivíduos. Além desta, outras características tornam as VNTRs importantes em estudos de marcadores moleculares. Estas seqüências são abundantes, apresentam altos níveis de variação alélica

(Toledo-Filho *et al.*, 1996) e ainda podem estar invertidas no genoma da espécie, flanqueando genes específicos (Heath *et al.*, 1993).

Seqüências de DNA repetitivo, como mini e microssatélites, constituem uma rica fonte de polimorfismo genético. Os microssatélites são repetições curtas (de 1 a 6 nucleotídeos), altamente polimórficas, que se encontram espalhadas pelo genoma de forma mais aleatória que as VNTRs. Por possuírem comportamento co-dominante e um alto número de alelos, estes marcadores são considerados extremamente eficientes para o estabelecimento de *pedigrees*, de mapas genéticos e para determinação dos níveis de diversidade genética (Fries, 1993).

A técnica denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), combinada com a técnica de PCR e com a utilização de sondas específicas, também tem possibilitado a determinação dos níveis de distância genética entre diferentes populações. A utilização de diversas enzimas de restrição permite a realização de cortes aleatórios em diferentes porções da molécula de DNA, podendo ser aplicada em estudos que consideram a análise de polimorfismos. A análise de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) também se baseia na clivagem do DNA com enzimas de restrição. Em geral, o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição e ligado a adaptadores específicos às regiões terminais dos fragmentos produzidos. A partir de então, uma fração destes fragmentos é amplificada via PCR utilizando-se *primers* que reconheçam as seqüências dos adaptadores utilizados. A análise e interpretação dos dados produzidos é feita

a partir de um gel de alta resolução que permite a identificação e separação dos fragmentos gerados (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Outra metodologia da biologia molecular, também empregada para identificação de marcadores moleculares e análise da diversidade genética, utiliza oligonucleotídeos em reações de PCR, construídos a partir de seqüências arbitrárias. Inicialmente, Williams *et al.* (1990) patentearam esta tecnologia com o nome de RAPD, entretanto, logo a seguir, Welsh e McClelland (1990) propuseram uma nova denominação, AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*), considerada mais adequada, uma vez que a seqüência dos *primers* utilizados é arbitrária e não a amplificação do fragmento de DNA. Entretanto, a técnica continuou sendo mais comumente conhecida como RAPD e a grande maioria dos trabalhos continua trazendo esta denominação em suas publicações.

2.4.2.1. A Técnica de RAPD

Independente do nome adotado e de pequenas variações que a técnica traz, a utilização de *primers* de seqüências arbitrárias abriu uma perspectiva nova para a análise genômica de indivíduos e populações que ainda possuem o seu genoma pouco explorado. Desta forma, a necessidade de conhecimento prévio de uma seqüência específica de DNA em uma espécie é eliminada e a técnica de PCR pode ser aplicada a diferentes grupos de organismos. Além disto, esta metodologia permite a amplificação de regiões do DNA transcritas e/ou não transcritas, possibilitando uma ampla

cobertura do genoma da espécie em estudo sem a necessidade de construção de bibliotecas genômicas e/ou utilização de isótopos radioativos, sendo, por isso, considerada uma metodologia de custo relativamente mais baixo. Devido a estas peculiaridades, a técnica de RAPD vem sendo utilizada nas mais diversas áreas do conhecimento, tanto em estudos que consideram a estrutura genética de populações naturais, quanto de espécies domesticadas, incluindo aquelas oriundas da atividade de cultivo (Dong e Zhou, 1998; Matioli e Passos-Bueno, 2001; Telles *et al.*, 2001).

Outra importante característica que faz dessa classe de marcadores, uma ferramenta bastante eficiente em estudos populacionais é a capacidade de gerar um grande número de locos polimórficos. Apesar da base molecular dos polimorfismos de RAPD ainda não ser inteiramente conhecida, acredita-se que mutações pontuais como deleções e inserções, podem impedir o anelamento do oligonucleotídeo iniciador com a região de DNA complementar a ele, gerando, desta forma, o alto grau de polimorfismo, freqüentemente, observado em estudos que utilizam este tipo de marcador (Ferreira e Gratapaglia, 1996; Williams *et al.*, 1990; Telles *et al.*, 2001).

A despeito de todas as vantagens que o uso de marcadores de seqüências arbitrárias traz, os fragmentos de DNA amplificados via RAPD apresentam "comportamento dominante", o qual impossibilita a identificação dos indivíduos heterozigotos. A presença de um único segmento, flanqueado por seqüências homólogas ao *primer* utilizado, já permite a amplificação de um fragmento com comprimento específico, impedindo a distinção entre o fenótipo molecular de indivíduos que possuem esta região em apenas um

cromossomo e aqueles que apresentam em ambos os cromossomos homólogos. Nestes, os fragmentos amplificados possuem tamanhos idênticos e, conseqüentemente, comportamentos de migração eletroforética equivalentes, se sobrepondo um ao outro, o que impossibilita a distinção entre eles. Além disto, a técnica pode apresentar algumas limitações em relação ao desconhecimento das seqüências de DNA do genoma da espécie em estudo que estão sendo amplificadas nas diferentes amostras analisadas e à baixa reprodutibilidade do padrão de fragmentos amplificados. A perfeita padronização na metodologia adotada (ciclo de reação, condições eletroforéticas, interpretação dos fragmentos) e a utilização de *kits* de PCR, especialmente desenvolvidos para reações de RAPD, podem minimizar eventuais distorções metodológicas, produzindo dados consistentes para comparações (Snnucks, 2000; Matioli e Passos-Bueno, 2001).

Apesar do método apresentar limitações (possibilidade de co-migração de bandas não homólogas e natureza dominante das marcas), muitos estudos têm utilizado a técnica de RAPD com bastante sucesso. Nesses casos, as ferramentas estatísticas utilizadas devem partir do pressuposto de que a ausência de um determinado fragmento em dois indivíduos não representa necessariamente similaridade genética entre eles, além do fato de indivíduos homozigotos não poderem ser distinguidos dos heterozigotos. Assim, ocorrências negativas devem ser desconsideradas (Barman *et al.*, 2003).

2.4.3. Estudos Genéticos em Camarão

Programas de estudos genéticos em camarões cultivados constituem hoje ferramenta básica para quaisquer ações que visem alcançar melhorias na atividade de cultivo. Diversos tipos de marcadores genéticos vêm sendo utilizados para investigação e caracterização da estrutura genética de populações de camarões (Chow e Sandifer, 1991; Benzie *et al.*, 1997). Estes estudos tiveram início na década de 70, quando marcadores enzimáticos foram primeiramente empregados para determinar os níveis de diversidade e distância genética de diferentes populações de peneídeos (Moav *et al.*, 1976; Hedgecock *et al.*, 1976).

Estudos realizados em linhagens de *M. japonicus* cultivadas na Itália, através da análise de 48 locos enzimáticos, demonstraram uma redução nos níveis de variação genética ao longo de seis gerações nascidas em cativeiro (Sbordoni *et al.*, 1986). Populações de *F. notialis* (Villaescusa *et al.*, 1984; Alonso *et al.*, 1987; Labacena *et al.*, 1994), *L. schmitti* (Espinosa *et al.*, 1989), *L. vannamei* (Sunden e Davis, 1991) *P. monodon* (Benzie *et al.*, 1992, 1993) e *L. stylirostris* (Labacena *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 1995) também tiveram sua estrutura genética caracterizada a partir da utilização de diferentes sistemas enzimáticos.

Aos poucos, os estudos enzimáticos foram sendo substituídos, uma vez que, em geral, estes marcadores apresentavam baixo grau de polimorfismo na grande maioria das espécies de camarões estudadas. As análises de DNA promoveram uma verdadeira revolução na carcinicultura

moderna, passando a ser amplamente utilizadas para se estimar os níveis de diversidade genética e simplificar planos experimentais, através da escolha dos representantes mais adequados para originar as gerações de cultivo (Harris *et al.*, 1991).

Em *L. vannamei*, famílias derivadas de populações de camarões SPF (*Specific Pathogen Free*), livres de patógenos específicos, que variam consideravelmente na performance de crescimento e na susceptibilidade a doenças, apresentaram baixa variabilidade genética. Níveis de variação genética diferenciados entre as populações estudadas, além de marcas genéticas específicas, foram estabelecidos através da utilização de marcadores de microssatélites (Wolfus *et al.*, 1997). Estas seqüências também foram utilizadas em estudos que consideram o estabelecimento de *pedigrees*, mapeamentos de ligação e identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (Moore *et al.*, 1999).

O número de microssatélites conhecido em camarões peneídeos, entretanto, ainda é muito pequeno e suas descrições são bastante recentes, o que torna o seu uso extremamente limitado. Em *P. monodon*, análises de alguns poucos locos de microssatélites permitiram inferir sobre a estrutura genética de populações selvagens do Sul da Tailândia (Tassanakajon *et al.*, 1998). Recentemente, outras 30 seqüências de microssatélites foram descritas para essa espécie, através da construção de bibliotecas genômicas enriquecidas (Wuthisuthimethavee *et al.*, 2003). Em *M. japonicus* estudos utilizando marcadores de microssatélites demonstraram uma alta heterozigosidade em populações selvagens (Moore *et al.*, 1999). López *et al.*

(2001) identificaram dois locos de microssatélite para o genoma de *L. schmitti*, enquanto que, em *L. vannamei*, cinco locos foram descritos e validados por Cruz *et al.* (2001).

Análises baseadas em marcadores de RFLP e VNTRs constituem uma eficiente alternativa para estudos de caracterização da estrutura genética de populações de camarões. A associação da técnica de RFLP a sondas de DNA genômico e a identificação de VNTRs permitiu o estudo da diversidade genética em diferentes estoques cultivados de camarões (Bagshaw e Buckolt, 1995). Em *L. vannamei*, análises utilizando *primers* de seqüências cerne de VNTRs, possibilitaram a determinação dos níveis de variabilidade e distância genética em estoques reprodutores de diferentes gerações de domesticação (Freitas e Galetti, 2002).

Análises de RAPD também têm se mostrado eficazes em estudos de diversidade genética de populações naturais (Tassanakajon *et al.*, 1997) e cativas (Garcia *et al.*, 1994). Estimativas de variabilidade genética e identificação de marcadores moleculares, através de ampliações de DNA utilizando *primers* de RAPD, foram reportadas para estoques de *L. vannamei* (Garcia *et al.*, 1994) e *P. monodon* (Tassanakajon *et al.*, 1997). Similarmente, D'Amato e Corach (1996) analisaram a distribuição geográfica e os níveis de diversidade genética de duas populações selvagens de *Macrobrachium borellii* através da utilização desses marcadores.

No Brasil os estudos genéticos em camarões cultivados são recentes e se iniciaram em 1998, com a criação do Centro de Estudos em Genética de Camarão (CEGENCAM, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal,

RN). A parceria entre o setor produtivo e órgãos governamentais possibilitou o desenvolvimento de inúmeros projetos de pesquisa que, ao longo desses anos, vêm consolidando esta importante área de atuação. Apesar do número de pesquisadores brasileiros ser ainda relativamente pequeno, a genética de camarão no Brasil apresenta, hoje, posição de destaque dentro do cenário nacional e internacional. A recente criação do Projeto Genoma Camarão reuniu diferentes grupos de pesquisa com o intuito de produzir dados que possam ser úteis para o estabelecimento de tecnologias que assegurem o desenvolvimento sustentável e econômico da atividade no país (<http://www.shrimp.ufscar.br>).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de Material

A coleta do material para estudos de DNA tem alguns aspectos que merecem ser destacados. O estado de conservação do tecido facilitará a obtenção de bons resultados. Tecidos em perfeito estado de conservação podem garantir o sucesso das etapas subsequentes dos experimentos realizados em laboratório. Portanto, a fixação do mesmo deve se dar de forma correta e eficiente. Pedacos muito grandes de tecido devem ser reduzidos a pedacos menores para promover uma melhor conservação do material e evitar a deteriorização de camadas mais internas.

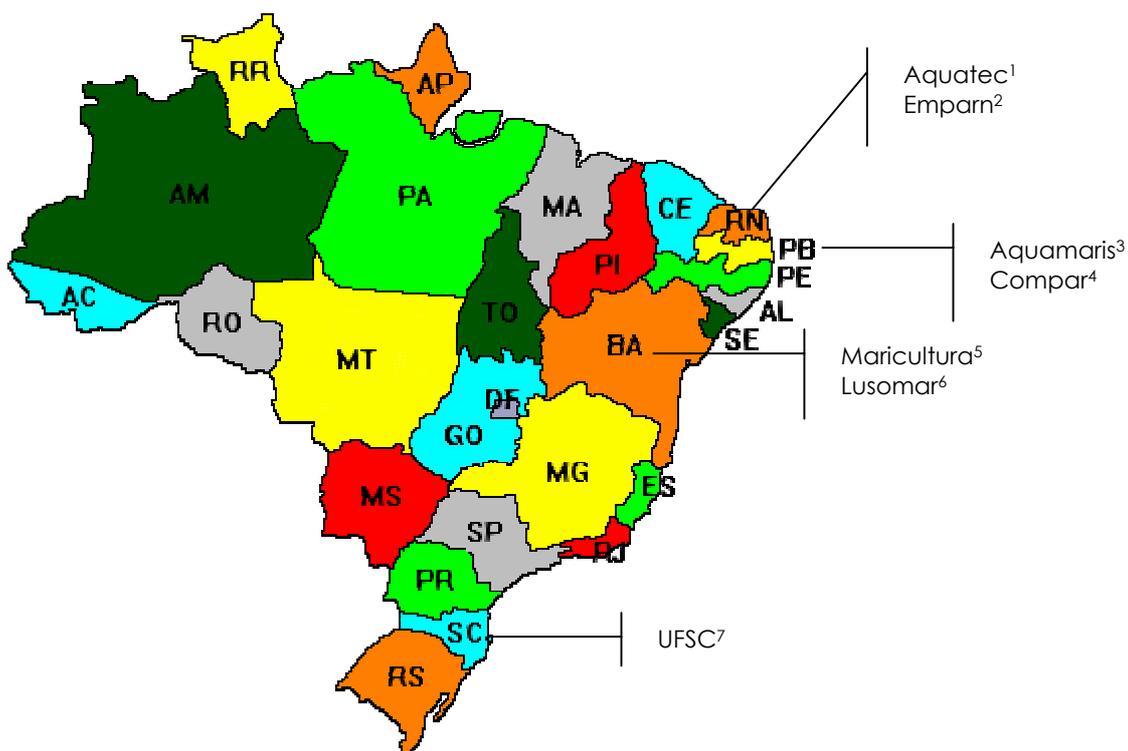
No caso de camarões, a musculatura abdominal é considerada como sendo o tecido mais apropriado para análises de DNA, uma vez que fornece uma boa quantidade de células musculares contendo material genético. Entretanto, para ser obtida, necessita que o animal seja sacrificado, o que muitas vezes inviabiliza a realização da coleta. Uma excelente alternativa é utilizar o segundo conjunto de apêndices abdominais, denominados pleópodos, os quais possuem uma quantidade razoável de tecido muscular, possibilitando a obtenção de material genético suficiente para ser utilizado em análises moleculares. Os pleópodos podem ser facilmente destacados do corpo do camarão com o auxílio de uma pinça cirúrgica. Este procedimento possibilita a sobrevivência do animal, não interferindo na performance do mesmo, uma vez que os pleópodos apresentam grande capacidade de regeneração. Para cada exemplar

estudado devem ser coletados de um a dois pleópodos, dependendo do tamanho (indivíduos maiores apresentam pleópodos maiores). O material deve ser acondicionado em tubos plásticos de 2 ml contendo cerca 1 ml de etanol absoluto e mantido em *freezer*, a uma temperatura de -20°C , até o momento da realização da extração de DNA. No caso de camarões cultivados, deve-se coletar de 20 a 30 exemplares pertencentes a cada um dos estoques a ser estudado. Este número amostral é considerado adequado uma vez que os estoques cativos de reprodutores de camarão apresentam número populacional relativamente reduzido quando comparado a populações naturais.

No presente estudo, os exemplares de camarões analisados, foram coletados em sete principais centros de produção de pós-larvas de *L. vannamei* do Brasil, localizados em diferentes estados do país (figura 4). Foram coletadas amostras de animais pertencentes a 19 plantéis de reprodutores, sendo cinco deles provenientes de uma única linhagem de endocruzamento produzida em cativeiro. Exemplares pertencentes a um plantel derivado desta mesma linhagem e considerado altamente resistente a hepatopancreatite necrosante (NHP), doença bacteriana que promove a necrose do hepatopâncreas, também foram coletados. Todos os exemplares foram sexados pela visualização direta das estruturas relacionadas ao sistema reprodutivo de cada sexo: a presença de petasma nos machos e de téglico nas fêmeas (figura 5). Cada indivíduo recebeu um número de registro e cada plantel uma nomenclatura adequada para posterior identificação e acompanhamento destes, junto aos laboratórios de larvicultura (tabela 4). Os

tecidos foram fixados em etanol absoluto e transportados para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos.

Figura 4: Mapa do Brasil evidenciando os locais de coleta onde foram amostrados os diferentes plantéis de reprodutores estudados no presente trabalho.



- Local de Coleta 1: Laboratório de Larvicultura Aquatec, localizado em Barra de Cunhaú, município de Ganguaretama, estado do Rio Grande do Norte.
- Local de Coleta 2: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Nordeste, localizada na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte.
- Local de Coleta 3: Laboratório de Larvicultura da Fazenda de Cultivo Aquamaris, localizada na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba.
- Local de Coleta 4: Laboratório de Larvicultura da Fazenda de Cultivo Compar, localizado na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba.
- Local de Coleta 5: Laboratório de Larvicultura da Fazenda de Cultivo Valença Maricultura da Bahia, localizada em Guaibim, município de Valença, estado da Bahia.
- Local de Coleta 6: Laboratório de Larvicultura da Fazenda de Cultivo Lusomar, localizada no município de Jandaíra, estado da Bahia.
- Local de Coleta 7: Laboratório de Larvicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, localizada na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina.

Figura 5: Fotografia da porção ventral de dois exemplares adultos de camarões *L. vannamei* indicando a presença de petasma nos machos (a) e de téglico nas fêmeas (b).



Tabela 4: Relação dos laboratórios de larvicultura visitados, dos plantéis coletados, das nomenclaturas adotadas, do número de registro de cada animal amostrado e do número de indivíduos coletados (N).

Laboratório	Plantel	Nomenclatura	Nº de Registro	N
Maricultura	V7 99 77 NHP	Mar NHP	001 a 030	30
Maricultura	V4 99 F6 A	Mar F ₆	031 a 050	20
Maricultura	V1 00 F7	Mar F ₇	051 a 070	20
Maricultura	V2 99 F5 B	Mar F ₅	071 a 090	20
Maricultura	V6 00 F8	Mar F ₈	619 a 638	20
Maricultura	V1 01 F9	Mar F ₉	579 a 598	20
Lusomar	VS 08 99 F0	Luso F ₀	091 a 121	31
Lusomar	VE 10 99 F2	Luso F ₂	122 a 150	29
Emparn	V1 00	Emparn F ₀	178 a 207	30
Aquatec	046 VAN	Aqua F ₁ (1)	208 a 237	30
Aquatec	051 VAN	Aqua F ₁ (2)	238 a 267	30
Aquatec	044 VAN	Aqua F ₃	268 a 297	30
Aquatec	045 VAN	Aqua F ₄	298 a 327	30
Aquamaris	V F0 07 00	Aquamaris F ₀	328 a 357	30
Compar	V1 F0 07 00	Com F ₀ (1)	378 a 406	29
Compar	V2 F0 00	Com F ₀ (2)	407 a 436	30
Compar	V3 F0 00	Com F ₀ (3)	437 a 466	30
UFSC	Maricultura/Ba 2	Ufsc F ₂	467 a 492	26
UFSC	Maricultura/Ba 1	Ufsc F ₀	493 a 524	32

No momento da coleta do material foi aplicado um guia de entrevistas composto por um questionário constituído por perguntas técnicas direcionadas ao setor de maturação (tabela 5). O guia foi elaborado para verificar a provável origem dos plantéis e o tipo de manejo adotado por cada um dos laboratórios de larvicultura existente no país.

Tabela 5: Questionário técnico direcionado ao setor de maturação dos laboratórios de produção de pós-larvas de *L. vannamei*.

Questionário de diagnóstico dos plantéis

01. Quantos plantéis de reprodução existem?
 02. Qual o local de origem desses plantéis utilizados?
 03. Os animais de um mesmo plantel têm a mesma origem e idade?
 04. Em que estágio os animais são transferidos para os viveiros de reprodutores?
 05. Há algum critério de seleção utilizado na escolha dos indivíduos que irão compor os plantéis de reprodutores?
 06. Qual a idade em que os camarões são transferidos para o laboratório de maturação?
 07. Quando os animais são transferidos para o laboratório de maturação é feito algum tipo de seleção?
 08. Os camarões mantidos em um mesmo tanque são provenientes de um mesmo viveiro (com mesma origem e idade)?
 09. Quantos casais são utilizados em cada tanque de maturação e por quanto tempo?
 10. Quantas vezes, em média, uma mesma fêmea pode contribuir para uma dada produção?
-

3.2. Extração de DNA de Tecidos Sólidos

A extração de DNA genômico pode ser realizada seguindo-se diferentes metodologias, incluindo a utilização de uma gama de *kits* de purificação, atualmente, disponíveis no mercado. Para obtenção de DNA a partir de pleópodos de camarões, a técnica utilizada nesse trabalho foi a descrita por Sambrook *et al.* (1989), que se baseia na utilização de fenol para separação da fase protéica. Apesar de eficiente, esta metodologia, no entanto, pode deixar remanescentes de fenol impregnados nas amostras analisadas, comprometendo a qualidade do DNA obtido. O fenol constitui-se em um potencial inibidor da enzima *Taq* DNA Polimerase, impossibilitando, em alguns casos, a amplificação de trechos do DNA. Para minimizar tal efeito deve-se diminuir ao máximo a concentração de DNA utilizado na PCR. Testes realizados em diferentes amostras demonstraram que concentrações de DNA de até 6 ng/ μ l podem ser utilizadas em reações que utilizam oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias. Desta forma, além de diminuir a concentração de fenol, diminui-se também a quantidade de outros contaminantes que por ventura possam vir a comprometer o sucesso da reação. Outra observação que deve ser ressaltada em relação à utilização de fenol diz respeito à qualidade do mesmo. O fenol é um reagente bastante vulnerável ao processo de oxidação (calor e luz) e uma vez oxidado pode também comprometer a PCR. Neste caso, uma reextração do material, utilizando-se um fenol em bom estado de preservação, pode ser realizada.

A extração de DNA baseada no método acima referido possibilitou a obtenção de boas quantidades de DNA (50 a 300 ng/ μ l) e baixa concentração de proteínas. O tratamento com as enzimas Proteinase K e RNase (Ribonuclease Pancreática Bovina) também são essenciais para garantir um DNA de excelente qualidade. Em camarões, o alto teor de polissacarídeos, presente no exoesqueleto dos animais, pode comprometer o sucesso da PCR. O protocolo utilizando fenol garante que boa parte deste material seja descartada durante o processo de purificação de DNA.

Como comentado anteriormente, os pleópodos do animal podem variar consideravelmente de tamanho, podendo-se utilizar uma ou mais unidades por animal. Para realização da extração de DNA, aproximadamente 200 mg (cerca de um pleópodo grande ou dois pequenos) de tecido foram colocados em um *graal* e macerados em nitrogênio líquido, com a ajuda de um pistilo. Após a maceração, 5 ml de solução de digestão, composta por 0,4 M de NaCl; 0,1 M de EDTA (pH 8,0); 100 μ l/ml de RNase; 0,1 % de SDS, foram adicionados ao tecido macerado e transferidos para tubos plásticos de 15 ml (tubo tipo falcon, resistente a fenol e clorofórmio). O tubo foi mantido por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após o período determinado, 100 μ l/ml de Proteinase K foram adicionados à solução e o tubo transferido para banho-maria a 50°C por 2 horas e 30 minutos. Durante sua permanência em banho-maria, o material foi periodicamente homogeneizado através de movimentos suaves realizados com as mãos. Esta fase tem como finalidade promover a digestão de componentes celulares indesejáveis, tais como, lipídeos, proteínas e RNA. Após esta etapa, o tubo permaneceu à temperatura ambiente,

adicionando-se a este igual volume (5 ml) de solução de extração, composta por fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. O material foi homogeneizado delicadamente por aproximadamente 30 minutos e centrifugado por 15 minutos em centrífuga a 3.000 rpm. Posteriormente, os tubos foram cuidadosamente retirados da centrífuga e o sobrenadante transferido para um novo tubo com o auxílio de uma micropipeta. Durante a etapa de centrifugação, o fenol arrasta restos de tecidos para o fundo do tubo juntamente com as proteínas degradadas. A fase contendo o DNA e alguns poucos resíduos de proteínas permanece numa camada superior separada do fenol por uma fina película. Assim, a transferência do sobrenadante deve ser realizada com bastante cuidado para que restos de tecidos e/ou proteínas não sejam aspirados. À solução transferida, foram adicionados 1 M de NaCl e cerca de 2 volumes de etanol absoluto gelado para que estes promovessem, respectivamente, a precipitação das proteínas e do DNA. O tubo foi vertido algumas vezes para facilitar a etapa de precipitação e em seguida centrifugado a 3.000 rpm por mais 15 minutos. O DNA em contato com o etanol poderá formar uma "nuvem" que freqüentemente pode ser observada a olho nu antes mesmo da centrifugação. Após a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi imediatamente descartado e ao *pellet* de DNA, formado no fundo do tubo, foram adicionados 3 ml de etanol 70% gelado. Este passo auxilia a retirada de resquícios de reagentes que por ventura tenham restado. O material foi novamente centrifugado por mais 15 minutos e o sobrenadante cuidadosamente descartado para que o *pellet* não se desprendesse do fundo

do tubo. O DNA foi mantido *overnight* em estufa a 37°C e posteriormente ressuspenso em aproximadamente 500 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), sendo transferido para tubos plásticos de 1,5 ml e acondicionados em freezer à temperatura de -20°C, logo após sua total dissolução.

3.3. Quantificação de DNA

Após a extração de DNA, o material foi devidamente quantificado. A quantificação pode ser realizada utilizando-se um espectrofotômetro ou um *ladder* que além do peso molecular também indique a concentração de cada um dos fragmentos que o compõem. Caso não haja a possibilidade de, rotineiramente, fazer uso das opções acima citadas, uma vez que muitos laboratórios não possuem espectrofotômetro e que marcadores desta natureza costumam ser relativamente caros, um DNA padrão, previamente quantificado, poderá ser utilizado como parâmetro de quantificação. É importante, entretanto, adotar uma única metodologia, visando-se minimizar variações entre os padrões de quantificação obtidos.

No presente estudo, a metodologia adotada consistiu na utilização do marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) que evidencia bandas de 200, 120, 80, 40, 20 e 10 ng. As amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose imerso em tampão TBE (1x) (Tris-Base, Ácido Bórico, EDTA), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml). O brometo de etídeo impregnado nos ácidos nucleicos, quando sob luz Ultra Violeta (UV) emitida pelo transiluminador permite a visualização dos mesmos. Uma banda de alto peso molecular,

correspondente à molécula de DNA, pode ser evidenciada. Através da comparação entre a intensidade da banda obtida com a dos demais fragmentos do marcador pode-se estimar a concentração de cada uma das amostras de DNA analisadas. Quando o DNA encontra-se muito degradado, ao invés de uma única banda bem evidente, visualiza-se um grande rastro difuso ao longo do gel. Resíduos de RNA também podem ser observados, quando verificada a presença de um fragmento de menor peso molecular. Eventualmente, quando o DNA obtido apresenta grande quantidade de contaminantes, uma banda superior permanece retida no gel no local de aplicação da amostra. Nestes casos, o DNA pode apresentar dificuldades durante o processo de amplificação. Estas informações devem ser relatadas juntamente com os dados obtidos de quantificação do material. Desta forma, eventuais problemas que venham a ocorrer durante a utilização do DNA nos diferentes experimentos realizados em laboratório poderão ser mais facilmente solucionados.

3.4. Acondicionamento das Amostras de DNA

Após realizada a quantificação do DNA, duas alíquotas do material foram acondicionadas a -20°C. Uma primeira, com volume aproximado de 50 µl, foi mantida para uso rotineiro em laboratório. Uma segunda alíquota foi reservada e estocada a -20°C no Banco de DNA do Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos. Este procedimento garante que parte do DNA extraído não seja degradada durante os processos

de congelamento e descongelamento sucessivos, usuais durante a realização dos experimentos em laboratório. Assim, a amostra de DNA estocada pode permanecer íntegra por um período de tempo relativamente maior. O DNA deve ser totalmente descongelado (temperatura ambiente) e homogeneizado com o auxílio de uma micropipeta antes de ser usado em quaisquer procedimentos em laboratório, seja para sua simples quantificação ou para sua utilização em reações de PCR.

3.5. Reações de Amplificação de DNA via RAPD-PCR

Após extraído e devidamente quantificado, o DNA está pronto para ser utilizado em diferentes procedimentos da Biologia Molecular, incluindo reações de amplificação e construção de bibliotecas genômicas. A amplificação de DNA via PCR se dá através da utilização de uma mistura de reagentes necessários para sintetizar novos segmentos da molécula. Um ciclo de reação, estabelecido em aparelho termociclador, no qual variam os tempos e as temperaturas, simula *in vitro* os fenômenos que ocorrem naturalmente nas células vivas durante o processo de replicação de DNA.

Um padrão de amplificação adequado deve ser obtido para cada reação. No caso do uso de oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias, as condições da reação são imprescindíveis para garantir resultados confiáveis. Deve-se fazer inúmeras variações nas concentrações dos reagentes e ciclos de reação até que se obtenha um padrão de amplificação altamente satisfatório. A repetibilidade do perfil de bandas obtido deve ser considerada

como essencial para estudos que analisam polimorfismos de RAPD. Cada reação deve utilizar quantidades suficientes de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), dinucleotídeos (dNTPs: Adenina, Guanina, Citosina e Timina), enzima DNA Polimerase, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e amostras do DNA *template*. Todos estes fatores influenciam no sucesso da amplificação, podendo ser adequados a diferentes situações, visando a otimização e o aumento da especificidade da reação.

A enzima *Taq* Polimerase, isolada do microorganismo *Thermus aquaticus*, resiste a altas temperaturas, sendo a mais comumente utilizada em reações de PCR. Em geral, para RAPD, costuma-se utilizar cerca de uma unidade de enzima por reação. Concentrações de *Taq* muito altas podem resultar na amplificação de regiões inespecíficas. Para seqüências mais complexas, no entanto, concentrações maiores são necessárias. Um dos componentes essenciais para que a DNA Polimerase atue é o magnésio. Em geral, costuma-se utilizar tampões que possuem em sua composição o $MgCl_2$. Entretanto quantidades complementares podem ser adicionadas à reação. A concentração de $MgCl_2$ pode ter um efeito significativo na especificidade da reação. Concentrações próximas a 1,5 mM, são geralmente adequadas. Entretanto, muitas vezes, são necessários ajustes. O excesso de $MgCl_2$ pode resultar na acumulação de produtos de amplificação não específicos. Por outro lado, concentrações insuficientes podem impossibilitar a amplificação de DNA. É necessário que haja magnésio disponível para que os dinucleotídeos possam ser adicionados pela *Taq*. A quantidade de dNTP na reação determinará a quantidade de magnésio livre. Concentrações de dNTP

muito altas também podem facilitar ou promover incorporações errôneas pela enzima *Taq* Polimerase. Em geral, costuma-se utilizar cerca 200 μ M de dNTP por reação.

Outro importante fator para o sucesso da amplificação de DNA via PCR está relacionado com as características dos *primers* utilizados. Em RAPD, os oligonucleotídeos costumam ser decâmeros e ter um mínimo de 50% de conteúdo de GC em sua composição. A concentração de *primer* encontra-se intimamente relacionada com a temperatura em que se dará o anelamento do mesmo com a região complementar. Quantidades próximas a 25 pmoles são suficientes em reações de RAPD. O DNA também pode se constituir num fator limitante da reação, sendo considerado por alguns autores como um dos parâmetros mais críticos da PCR. Apesar da técnica de RAPD não necessitar de um DNA extremamente puro, sua qualidade pode interferir nos resultados obtidos. Dependendo da quantidade de contaminantes (restos de proteínas, RNA, polissacarídeos, fenol) nas amostras, a amplificação pode não ocorrer. Como mencionado no item relativo à extração de DNA, a diminuição nas concentrações de DNA pode facilitar o seu uso. Em geral concentrações entre 10 e 100ng produzem resultados satisfatórios. Adicionalmente deve-se ainda fazer uso de alguns componentes tamponantes e estabilizadores da reação. A composição dos tampões, em geral, inclui Tris-HCl, KCl e gelatina. Cerca de 1/10 de tampão (10x) costuma ser utilizado por volume final de reação.

No presente estudo, após inúmeros testes realizados com diferentes protocolos, passou-se a utilizar o *kit Ready-To-Go RAPD Analysis Bead* (Amersham Pharmacia), especialmente desenvolvido para reações de RAPD.

Este *Kit* é composto por 100 reações individuais, que se apresentam sob a forma de esferas liofilizadas, denominadas *beads*, contidas em tubos de 0,5 μL . Cada *bead* é composto por enzimas DNA Polimerase termoestáveis (*AmpliTaq™ DNA Polymerase* e *Stoffel Fragment*) em concentrações não determinadas pelo fabricante, 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 μg de BSA (*Bovine Serum Albumine*), 3 mM de MgCl_2 , 30 mM de KCl e 10 mM Tris (pH 8,3). Para sua utilização, foram feitos ajustes em relação ao ciclo de reação e às concentrações dos *primers* e das amostras de DNA utilizadas. Foi testado um total de 38 oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias (tabela 6), dos quais seis foram selecionados. Cerca de 50 ng de DNA e 25 pmoles de *primer* foram utilizados em 25 μL de volume final de reação. Ao tubo foram adicionados 19 μL de água milliQ, 5 μL de *primer* (em estoque a 5 pmol/ μL) e 1 μL de DNA na concentração previamente estabelecida. Os microtubos foram delicadamente homogeneizados e centrifugados por 2 segundos em microcentrífuga a 1000 rpm. Posteriormente, estes foram transferidos para o termociclador, iniciando o processo de amplificação. Para reações de RAPD-PCR deve-se procurar utilizar sempre um mesmo aparelho, minimizando possíveis diferenças entre os padrões de amplificação obtidos, decorrentes de diferenças entre os aparelhos utilizados.

Durante a adição dos reagentes os microtubos foram mantidos a uma temperatura de -4°C , sendo o DNA o último componente a ser adicionado. Desta forma, evita-se, respectivamente, possíveis perdas de atividade dos reagentes e/ou contaminações no material. Terminada a reação, os microtubos foram mantidos a -20°C , para posterior visualização dos produtos em gel de agarose.

Tabela 6: Seqüências dos *primers* de RAPD testados no presente trabalho.

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' - 3')
1 (Amersham Pharmacia)	GGTGCGGGAA
2 (Amersham Pharmacia)	GTTTCGCTCC
3 (Amersham Pharmacia)	GTAGACCCGT
4 (Amersham Pharmacia)	AAGAGCCCGT
5 (Amersham Pharmacia)	AACGCGCAAC
6 (Amersham Pharmacia)	CCCCTCAGCA
A9 (Garcia et al., 1994)	GGGTAACGCC
A10 (Garcia et al., 1994)	GTGATCGCAG
A20 (Garcia et al., 1994)	GTGCGATCC
B11 (Garcia et al., 1994)	GTAGACCCGT
B14 (Garcia et al., 1994)	TCCGCTCTGG
B20 (Garcia et al., 1994)	GGACCCITAC
101 (Tassanakajon et al., 1997)	GCGCCTGGAG
174 (Tassanakajon et al., 1997)	AACGGGCAGG
428 (Tassanakajon et al., 1997)	GGCTGCGGTA
456 (Tassanakajon et al., 1997)	GCGGAGGTCC
457 (Tassanakajon et al., 1997)	CGACGCCCTG
459 (Tassanakajon et al., 1997)	GCGTCGAGGG
OPP-01 (Operon Technologies)	GTAGCACTCC
OPP-02 (Operon Technologies)	TCGGCACGCA
OPP-03 (Operon Technologies)	CTGATACGCC
OPP-04 (Operon Technologies)	GTGTCTCAGG
OPP-05 (Operon Technologies)	CCCCGGTAAC
OPP-06 (Operon Technologies)	GTGGGCTGAC
OPP-07 (Operon Technologies)	GTCCATGCCA
OPP-08 (Operon Technologies)	ACATCGCCCA
OPP-09 (Operon Technologies)	GTGGTCCGCA
OPP-10 (Operon Technologies)	TCCCGCCTAC
OPP-11 (Operon Technologies)	AACGCGTCGG
OPP-12 (Operon Technologies)	AAGGGCGAGT
OPP-13 (Operon Technologies)	GGAGTGCCTC
OPP-14 (Operon Technologies)	CCAGCCGAAC
OPP-15 (Operon Technologies)	GGAAGCCAAC
OPP-16 (Operon Technologies)	CCAAGCTGCC
OPP-17 (Operon Technologies)	TGACCCGCTT
OPP-18 (Operon Technologies)	GGCTTGGCCT
OPP-19 (Operon Technologies)	GGGAAGGACA
OPP-20 (Operon Technologies)	GACCCTAGTC

Neste estudo, as amplificações de DNA foram realizadas em termociclador *MJ Research, INC, modelo PTC 100*, programado da seguinte forma: 4 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 92°C; 1,5 minuto a

37°C e 2 minutos a 72°C, com extensão final de 3 minutos a 72°C. Cada temperatura e tempo estabelecidos são responsáveis por uma etapa determinante no processo de amplificação do DNA. Uma etapa inicial garante que todo o DNA fita dupla seja previamente desnaturado. O aquecimento insuficiente durante o primeiro passo de desnaturação costuma ser uma falha nas reações de PCR. Este passo é extremamente importante e uma temperatura de 94°C é adequada para maioria dos casos. Posteriormente, iniciam-se os ciclos de reações caracterizados pelas etapas de desnaturação, ligação ou hibridação do oligonucleotídeo à região de DNA complementar e, finalmente, replicação dos segmentos específicos da molécula. Após um determinado número de repetições (que pode variar entre 35 a 50 vezes), são produzidas inúmeras cópias de uma região de DNA, flanqueada pela seqüência dos oligonucleotídeos utilizados, cujo número é definido por 2^n , onde n é o número total de ciclos. Ao final do último ciclo, a temperatura de extensão deve permanecer por um tempo relativamente maior para que o processo de extensão de regiões que estavam sendo amplificadas possa ser finalizado.

Para se determinar a temperatura de hibridação ou *annealing* deve-se levar em consideração as características dos *primers* utilizados. O *primer* se hibridará à região alvo através da diminuição da temperatura de desnaturação. Em geral, para oligonucleotídeos de 15 bases costuma-se utilizar temperaturas que variam entre 40 e 50°C. Para *primers* com 20 bases temperaturas superiores são mais indicadas. *Primers* menores, como os

utilizados no presente trabalho, necessitam, no entanto, de temperaturas mais baixas.

3.5.1. Análise Eletroforética dos Fragmentos Amplificados

A análise eletroforética dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,5%, imerso em TBE (1x), submetido a uma condição de corrida de 100 volts por 3 horas. Além das amostras amplificadas, um marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen) também foi aplicado para estimar o provável tamanho dos fragmentos amplificados. Todas as imagens analisadas foram fotodocumentadas através da utilização do sistema de imagem *Kodak Digital Science™ EDAS 290*, desenvolvido para análise e documentação de géis de eletroforese, conforme instruções do fabricante.

É importante destacar que, antes do estabelecimento das condições para análise eletroforética, deve-se testar variações na concentração do gel, na voltagem e no tempo de corrida para cada padrão de amplificação obtido. Concentrações iniciais de 1% são indicadas para fragmentos com pesos moleculares bem discrepantes. Para fragmentos com tamanhos muito próximos, deve-se, no entanto, aumentar a concentração do gel. Quanto maior a concentração do gel, maior será o seu poder de resolução. Concentrações mais altas possibilitam uma distinção melhor entre os fragmentos, entretanto, necessitam de um maior tempo de corrida, principalmente, se estes fragmentos possuírem pesos moleculares muito próximos. O prolongamento demasiado no tempo de corrida pode diminuir a nitidez da imagem visualizada em

transiluminador, devido à dispersão de parte da amostra de DNA aplicada no gel. A voltagem utilizada também não deve ser muito alta para que não ocorram distorções na imagem formada. Uma vez padronizadas as condições de corrida, tal procedimento deve ser fidedignamente reproduzido para que o perfil de bandas obtido para as diferentes amostras analisadas possa ser corretamente interpretado.

3.6. Análises Estatísticas Multifocus

Somente os produtos amplificados que apresentaram alta reprodutibilidade foram selecionados para as análises estatísticas. Os fragmentos foram nomeados e os pesos moleculares aproximados determinados. Com o auxílio de uma régua, cada banda foi identificada e analisada nas diferentes amostras estudadas. Matrizes binárias, baseadas na presença (1) ou ausência (0) de cada fragmento, foram construídas e submetidas a uma análise estatística descritiva para dados diplóides com comportamento dominante.

Foram calculadas as porcentagens de locos polimórficos, as freqüências gênicas (Nei, 1987), os índices de diversidade (Nei, 1973), distância (Nei, 1972) e identidade (Nei, 1978) genéticas e construído um dendograma de similaridade genética baseado no método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) (Sneath e Sokal, 1973), através da utilização do programa computacional Popgene, versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Diferenças significativas ($p < 0,05$) para os valores de

freqüência gênica foram testadas com base na análise de qui-quadrado e teste de homogeneidade entre as amostras.

O coeficiente de similaridade genética de Jaccard (1901) foi obtido através da utilização do software NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 1.80 (Rohlf, 1993). Diferenças significativas entre os coeficientes de Jaccard foram verificadas através da realização dos testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis, utilizando-se o programa BioEstat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000). Todos os valores de similaridade genética obtidos para a linhagem de endocruzamento foram submetidos a uma análise de regressão linear e não-linear no programa *Microsoft Excel*, versão para *Windows 99* (*Microsoft Word*).

Todos os programas estatísticos utilizados seguiram os procedimentos básicos de utilização contidos nos seus respectivos manuais de instrução. As análises estatísticas realizadas com base nos diferentes fragmentos selecionados partiram do pressuposto de que cada loco possui dois alelos, os quais apresentam comportamento mendeliano.

O coeficiente de similaridade genética de Jaccard, comumente utilizado no passado para estimar os níveis de diversidade de espécie em duas ou mais populações, atualmente, vem sendo extremamente aplicado para estimativas de variabilidade genética em populações analisadas através de marcadores moleculares com comportamento dominante, uma vez que não considera discordâncias como indicativo de similaridade genética. Ele pode ser expresso através da fórmula: $S_J = a / a + b + c$, onde a corresponde ao número total de bandas coincidentes em dois indivíduos x e y , b ao número

total de bandas exclusivas em um indivíduo x e c ao número total de bandas presentes em y e ausentes em x .

As freqüências alélicas (q), comumente determinadas através da fórmula: $q_{x_a x_a} = N_{aa}/N$ e $q_{y_a y_b} = \sum N_{ab}/N$, com $a \neq b$, onde N é o número total de indivíduos analisados, N_{aa} é o número de indivíduos com genótipo homozigoto $x_a x_a$ e N_{ab} é o número de indivíduos com genótipo heterozigoto $y_a y_b$, para dados dominantes deve considerar o número de indivíduos que não apresentam o fragmento para um determinado loco e o número total de indivíduos analisados. A diversidade genética (h) estima a variabilidade genética com base na freqüência esperada de indivíduos heterozigotos e no número de alelos que são mantidos para cada loco considerado. Ela reflete o polimorfismo de uma população, podendo ser expressa através da fórmula: $h_n = \sum N_{ab}$, com $a \neq b$, N_{ab} igual à freqüência de indivíduos heterozigotos observados na população e n igual ao loco considerado. A percentagem de locos polimórficos (f) é dada a partir do número de locos observados que se apresenta diferenciado entre si e é expressa por: $f = p/m$, onde p é o número total de locos polimórficos e m é o número total de locos analisados. Ela também reflete o grau de polimorfismo de uma população, sendo comumente utilizada para estimar os níveis de diversidade genética em estudos que consideram a análise de marcadores com comportamento dominante.

Os valores de distância (D) e identidade (I) genética refletem, respectivamente, o grau de diferenciação e de proximidade genética entre diferentes indivíduos ou populações. Em geral, costuma-se considerar a

MATERIAL E MÉTODOS

Identidade como sendo: $I=1-D$, com $D= -\ln (q_{1-2}/\sqrt{q_1 \cdot q_2})$, onde q_1 e q_2 são, respectivamente, a homozigosidade nas populações 1 e 2 para todos os locos analisados e q_{1-2} a homozigosidade média determinada para as duas populações.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico de Origem, Geração e Manejo para os Diferentes Plantéis Analisados

4.1.1. Fundação dos Plantéis: Geração e Origem

Atualmente, existem no país inúmeros plantéis de reprodutores que podem ou não diferir entre si com relação à origem e ao número de gerações produzidas em cativeiro. Muitos plantéis foram formados a partir da importação direta de animais provenientes do México, Costa Rica, Panamá, Equador e Venezuela, e também através da obtenção de animais pertencentes a laboratórios localizados no próprio país. Alguns plantéis foram compostos por animais provindos de um único local, entretanto, plantéis originados a partir de animais de diferentes procedências também foram verificados. Devido a esta particularidade, a geração em cativeiro diagnosticada para cada plantel analisado, foi relatada como sendo aquela produzida pelo laboratório que o fundou. Desta forma, plantéis que possuem indivíduos em F0 ou F1 podem não corresponder a populações selvagens ou derivadas destas, respectivamente, uma vez que foram fundados a partir de indivíduos que já se encontravam em domesticação em outros centros de cultivos. A tabela 7 sumariza os dados obtidos para os diferentes plantéis analisados.

RESULTADOS

Tabela 7: Diagnóstico de origem e geração para os diferentes plantéis estudados, com base nas respostas obtidas através da aplicação do guia de entrevistas.

Empresa	Plantel	Geração	Origem
Maricultura (BA)	Mar F ₅	F5	Plantel descendente da geração F4, que foi inicialmente composta a partir do cruzamento entre indivíduos em F3, que por sua vez foram originados da geração F2, e esta da geração F1 que se constitui a primeira geração em cativeiro descendente de animais importados do Panamá (80%) e Equador, México, Costa Rica e Venezuela (20%).
Maricultura (BA)	Mar F ₆	F6	Geração descendente do plantel Mar F5 (Maricultura)
Maricultura (BA)	Mar F ₇	F7	Geração descendente do plantel Mar F6 (Maricultura)
Maricultura (BA)	Mar F ₈	F8	Geração descendente do plantel Mar F7 (Maricultura)
Maricultura (BA)	Mar F ₉	F9	Geração descendente do plantel Mar F8 (Maricultura)
Maricultura (BA)	Mar NHP	F7	Animais derivados do plantel Mar F7 (Maricultura), após contágio com bactérias causadoras de necrose no hepatopâncreas (NHP)
Lusomar (BA)	Lus F ₀	F0	Animais obtidos do centro de cultivo SECOM
Lusomar (BA)	Lus F ₂	F2	Animais obtidos do centro de cultivo EDUARDO LEMOS
Emparn (RN)	Emparn F ₀	F0	Animais obtidos do centro de cultivo TECNARÃO
Aquatec (RN)	Aqua F ₁ (1)	F1	Animais provenientes do Panamá, da LUSOMAR e da SECOM
Aquatec (RN)	Aqua F ₁ (2)	F1	Animais provenientes do Panamá e da SECOM
Aquatec (RN)	Aqua F ₃	F3	Animais provenientes do Panamá e da LUSOMAR
Aquatec (RN)	Aqua F ₄	F4	Animais provenientes do Panamá, da LUSOMAR e de viveiros de engorda do centro de cultivo CAMANOR
Aquamaris (PB)	Aquamaris F ₀	F0	Náuplios obtidos da AQUALIDER e pós-larvas da COMPAR
Compar (PB)	Com F ₀ (1)	F0	Animais provenientes dos viveiros de engorda da COMPAR
Compar (PB)	Com F ₀ (2)	F0	Animais provenientes dos viveiros de engorda da COMPAR
Compar (PB)	Com F ₀ (3)	F0	Animais provenientes dos viveiros de engorda da COMPAR
UFSC (SC)	Ufsc F ₂	F2	Náuplios provenientes da MARICULTURA
UFSC (SC)	Ufsc F ₀	F0	Náuplios provenientes da MARICULTURA

Nota: Os centros de cultivo SECOM, EDUARDO LEMOS, TECNARÃO e CAMANOR, citados na tabela acima, utilizam animais provenientes de diferentes fazendas de engorda, tendo os seus estoques, portanto, múltiplas origens.

4.1.2. Manutenção dos Plantéis: Seleção e Manejo

O manejo realizado para garantir a manutenção das linhagens matrizes, em geral, não utiliza animais provindos de diferentes estoques, sendo o plantel reprodutor mantido como uma linha pura. Uma vez constituído o plantel, a sua continuidade somente ocorre a partir de cruzamentos realizados entre indivíduos pertencentes àquele mesmo plantel, sem incremento de novos *pools* gênicos. Menos freqüentemente, alguns estoques reprodutores são mantidos a partir da utilização de pós-larvas obtidas de viveiros comerciais. Para garantir a produção comercial de camarão, entretanto, os diferentes centros de produção de pós-larvas utilizam reprodutores provenientes de diferentes plantéis, sem que haja uma preocupação em relação à origem e geração dos mesmos. Desta forma, as milhares de pós-larvas que irão povoar os viveiros de engorda das inúmeras fazendas de camarão espalhadas pelo país são progênies de reprodutores de diferentes plantéis.

Outra importante característica de manejo refere-se à seleção dos animais que serão utilizados para originar as gerações subseqüentes de um plantel. Em geral, a escolha dos reprodutores é realizada através da observação visual do fenótipo dos camarões e ocorre por volta dos 3 meses de idade, podendo variar entre 70 a 100 dias de vida. Os critérios de seleção utilizados se baseiam, comumente, na morfologia externa do animal (animais sem necroses, com antenas perfeitas e rostro sem deformidades) e principalmente no tamanho do indivíduo.

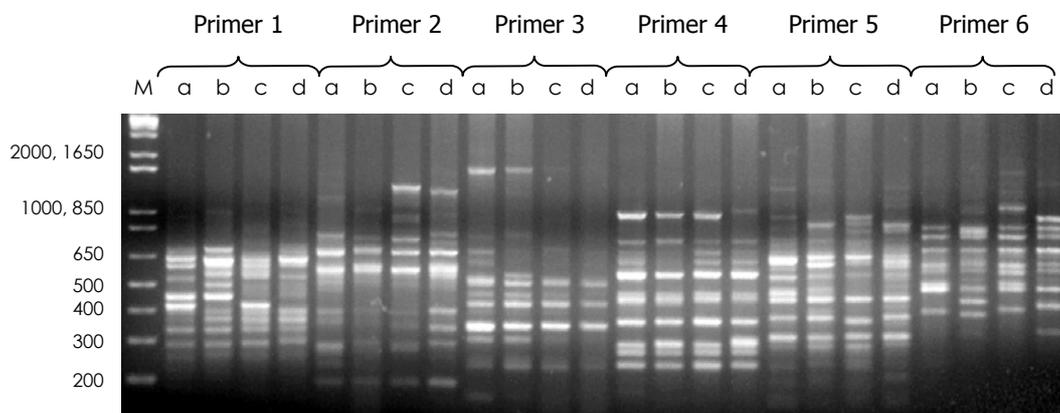
Ocasionalmente, uma seleção anterior a esta pode ser realizada ainda durante o estágio de pós-larva. Neste caso, os critérios de seleção adotados baseiam-se na diversificação do plantel, considerando pós-larvas provenientes de desovas de múltiplas fêmeas, ou no tamanho dos indivíduos, escolhendo as pós-larvas de maior tamanho. Próximo ao oitavo mês de vida, uma nova seleção é realizada e alguns indivíduos são transferidos dos viveiros de reprodutores, para os tanques de maturação. A escolha dos animais, novamente, é baseada no aspecto externo do camarão. São observadas as antenas, as brânquias, a coloração dos urópodos e, nos machos, a pigmentação dos espermatóforos. Os animais maiores e mais saudáveis (com ausência de necroses e outras deformidades) são selecionados e transferidos para o setor de maturação. Em geral, costuma-se utilizar cerca de 60 a 80 casais por tanque de maturação, com uma densidade média de 5 animais/m², embora, 15 casais/tanque e 100 casais/tanque também tenham sido relatados.

Apesar das respostas obtidas através da aplicação do questionário não terem sido suficientemente esclarecedoras quanto a origem e a geração exata dos diferentes plantéis analisados, elas apresentaram importância fundamental para o levantamento de informações relacionadas ao manejo, sua implicação na estrutura genética destes estoques e, principalmente, para a análise e interpretação dos dados moleculares produzidos no presente trabalho.

4.2. Análise de Diversidade e Distância Genética para os Diferentes Estoques Reprodutores Analisados com Base na Identificação de Marcadores Moleculares de RAPD

Os resultados obtidos através da amplificação de DNA utilizando-se os oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em reações de RAPD produziram um padrão de fragmentos bastante eficiente (figura 5), do qual foram selecionados 64 fragmentos (tabela 8), que permitiram o estabelecimento de relações genéticas e estimativas dos níveis de diversidade genética para os diferentes plantéis estudados. Perfis de amplificação altamente reprodutíveis foram encontrados para todos os *primers* utilizados, quando o DNA de um mesmo indivíduo foi submetido a três reações independentes de RAPD, para cada *primer* utilizado (figura 6).

Figura 6: Gel de agarose evidenciando padrão de amplificação de DNA obtido para diferentes amostras de DNA de camarão (a, b, c, d) analisadas, utilizando-se os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em reações de RAPD.

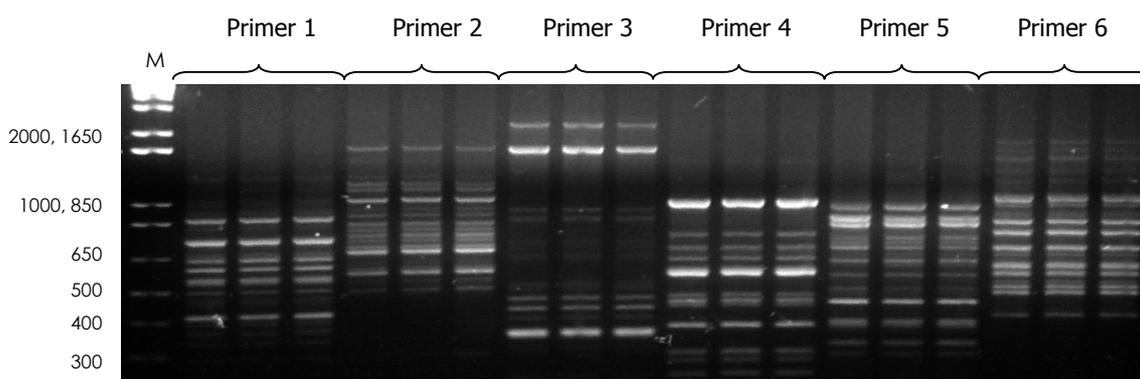


RESULTADOS

Tabela 8: Nomenclatura adotada e peso molecular estimado (entre parênteses) para os diferentes fragmentos amplificados, através da utilização dos *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em reações de RAPD.

Nomenclatura e peso molecular (pb) para fragmento identificado					
<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>	<i>Primer 3</i>	<i>Primer 4</i>	<i>Primer 5</i>	<i>Primer 6</i>
P1-a ₁ (700)	P2-a ₁ (710)	P3-a ₁ (900)	P4-a ₁ (900)	P5-a ₁ (850)	P6-a ₁ (800)
P1-b ₂ (670)	P2-b ₂ (700)	P3-b ₂ (850)	P4-b ₂ (840)	P5-b ₂ (800)	P6-b ₂ (660)
P1-c ₃ (650)	P2-c ₃ (660)	P3-c ₃ (700)	P4-c ₃ (600)	P5-c ₃ (700)	P6-c ₃ (630)
P1-d ₄ (560)	P2-d ₄ (640)	P3-d ₄ (660)	P4-d ₄ (520)	P5-d ₄ (660)	P6-d ₄ (600)
P1-e ₅ (530)	P2-e ₅ (550)	P3-e ₅ (650)	P4-e ₅ (430)	P5-e ₅ (620)	P6-e ₅ (530)
P1-f ₆ (500)	P2-f ₆ (530)	P3-f ₆ (640)	P4-f ₆ (400)	P5-f ₆ (540)	P6-f ₆ (500)
P1-g ₇ (430)	P2-g ₇ (500)	P3-g ₇ (510)	P4-g ₇ (350)	P5-g ₇ (510)	P6-g ₇ (470)
P1-h ₈ (410)	-	P3-h ₈ (500)	P4-h ₈ (290)	P5-h ₈ (500)	P6-h ₈ (460)
P1-i ₉ (400)	-	P3-i ₉ (450)	P4-i ₉ (270)	P5-i ₉ (490)	P6-i ₉ (420)
P1-j ₁₀ (360)	-	P3-j ₁₀ (410)	P4-j ₁₀ (220)	P5-j ₁₀ (470)	-
P1-k ₁₁ (300)	-	P3-k ₁₁ (380)	-	P5-k ₁₁ (430)	-
-	-	P3-l ₁₂ (340)	-	P5-l ₁₂ (390)	-
-	-	-	-	P5-m ₁₃ (360)	-
-	-	-	-	P5-n ₁₄ (310)	-
-	-	-	-	P5-o ₁₅ (290)	-

Figura 7: Gel de agarose demonstrando o perfil de repetibilidade dos fragmentos de DNA obtidos, a partir de uma única amostra de DNA de camarão amplificada com os *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em três sucessivas reações de PCR.



4.2.1. Relações de Diversidade e Distância Genética Estabelecidas para 15 Plantéis de Reprodutores Analisados

Do total de 53 fragmentos considerados para os 15 plantéis analisados, 52 deles apresentaram-se polimórficos para o conjunto total de 252 amostras analisadas (tabela 9). O grau de polimorfismo encontrado para cada plantel variou de um mínimo de 29 locos polimórficos observados para o plantel Ufsc F2 e um máximo de 41 locos para o plantel Luso F0. O *primer* 4 apresentou o maior número de fragmentos monomórficos observados para o conjunto total de amostras analisadas. Por outro lado, o *primer* 3 foi o que se apresentou mais polimórfico, com o menor número de bandas monomórficas por plantel.

RESULTADOS

Tabela 9: Número total de fragmentos polimórficos identificados para o total de indivíduos amostrado em cada plantel analisado.

Plantel	Nº de indivíduos	Número de locos polimórficos identificados					Total
		primer 2	primer 3	primer 4	primer 5	primer 6	
Aqua F1 (1)	20	07	09	06	11	04	37
Aqua F1 (2)	20	04	09	03	14	03	33
Aqua F3	18	06	09	05	12	03	35
Aqua F4	20	05	09	04	13	05	36
Aquamaris F0	10	05	07	06	12	02	32
Com F0 (1)	10	03	08	03	12	04	30
Com F0 (2)	10	05	09	05	12	03	34
Com F0 (3)	10	04	08	06	11	05	34
Ufsc F2	10	01	10	03	10	05	29
Ufsc F0	10	03	09	03	10	05	30
Mar F7	20	05	09	06	10	07	37
Mar NHP	26	06	09	05	11	06	37
Emparn F0	08	06	09	02	11	04	32
Luso F0	30	05	10	06	14	06	41
Luso F2	30	06	09	05	13	06	39
Total	252	07	12	10	15	09	52

Os valores de diversidade genética de Nei (tabela 10) calculados para os diferentes plantéis analisados variaram de 22,59% a 26,31% para os plantéis Aqua F1 (2) e Aqua F1 (1), respectivamente, demonstrando reduzida variabilidade genética quando comparados com plantéis em fase de domesticação mais avançada. Os coeficientes de similaridade genética de Jaccard (tabela 11) também evidenciaram grande homogeneidade genética intrapopulacional, revelando índices próximos a 70% para a maioria dos plantéis analisados. O plantel que se apresentou geneticamente mais variável foi o Com F0 (3), apresentando o menor valor de similaridade genética observado (65%). O plantel Aquamaris F0, por sua vez, evidenciou indivíduos geneticamente mais homogêneos, com coeficiente de similaridade próximo a 75%.

RESULTADOS

Tabela 10: Valores de diversidade genética de Nei determinados para os diferentes plantéis analisados.

fragmento	Diversidade Gênica														
	Mar NHP	Mar F7	Luso F0	Luso F2	Emparn F0	Aqua F1(1)	Aqua F1(2)	Aqua F3	Aqua F4	Aquamaris F0	Com F0(1)	Com F0(2)	Com F0(3)	Ufsc F2	Ufsc F0
P2-a₁	0,4763	0,3472	0	0,2985	0,4571	0,4325	0	0,3603	0	0,4325	0,4325	0,4325	0,4142	0	0
P2-b₂	0,3907	0	0,0974	0,1889	0,4747	0,0974	0	0,3412	0,2733	0,0974	0	0,0974	0	0	0
P2-c₃	0,3153	0	0,2985	0,4832	0,4571	0,4325	0,3472	0,4444	0,4325	0	0	0	0,4944	0	0
P2-d₄	0,3907	0,4416	0,0655	0,2733	0,2321	0,0974	0,1889	0,2552	0,0974	0,0974	0	0	0	0	0,1889
P2-e₅	0	0,3472	0	0	0	0,3472	0	0	0	0	0	0,0974	0	0	0
P2-f₆	0,4547	0,4649	0,1286	0,0974	0,2321	0,3832	0,4416	0,1078	0,4416	0,4142	0,2733	0,2733	0,2733	0	0,3492
P2-g₇	0,2157	0,4832	0,4649	0,4329	0,5000	0,4649	0,3492	0,4694	0,4954	0,4944	0,4649	0,4649	0,4142	0,4649	0,4649
P3-a₁	0,1820	0,2733	0,4994	0,4880	0,3311	0,4954	0,3832	0,1591	0,1439	0,4142	0,4142	0,4944	0,4649	0,4325	0,4649
P3-b₂	0,3653	0,4746	0,1889	0,0655	0,5000	0,4649	0,3492	0,4142	0,3832	0,3492	0,3492	0,1889	0,1889	0,2733	0,4649
P3-c₃	0,1820	0,2321	0,4499	0,2460	0,4142	0,4416	0,2321	0,4142	0,2733	0,3492	0,4142	0,2733	0,2733	0,4954	0,3492
P3-d₄	0,2482	0,2321	0,1889	0,2997	0,3311	0,4416	0,4954	0,4694	0,3832	0,4944	0,3492	0,0974	0,3492	0,4944	0,4944
P3-e₅	0,3653	0,0974	0,3939	0,4777	0,4571	0,4832	0,4416	0,3796	0,4954	0,4944	0,4649	0,4325	0,3492	0,4649	0,4944
P3-f₆	0,2482	0,2733	0,1889	0,1889	0,4571	0,4832	0,3832	0,4880	0,4944	0,4649	0,3492	0,4325	0,4954	0,4944	0,4954
P3-g₇	0,1118	0,2733	0,4944	0,4499	0	0,5000	0,4325	0,2552	0,4832	0,0	0,4944	0,4954	0,4954	0,4325	0,4954
P3-h₈	0,1820	0,4416	0,4832	0,4325	0,5000	0,3472	0,4416	0,3603	0	0,4954	0,4649	0	0,4954	0	0
P3-i₉	0	0	0	0	0,5000	0,4944	0	0,3603	0	0	0	0,4325	0	0,4325	0
P3-j₁₀	0,4009	0,4954	0,4636	0,4325	0,5000	0	0,3472	0	0,4142	0	0	0,4325	0	0,4325	0,4325
P3-k₁₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4416	0	0	0	0	0,4649	0,3492
P3-l₁₂	0	0	0,2985	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P4-a₁	0,4009	0,4954	0,3831	0	0	0,4325	0	0,3603	0	0,4325	0	0	0,4325	0	0
P4-b₂	0,4009	0,1439	0,4777	0,4832	0,2321	0,0494	0,2733	0,2083	0,3125	0,0974	0,2733	0,4142	0,0974	0,2733	0,2733
P4-c₃	0,3153	0,4832	0,4832	0,3831	0	0,3472	0	0	0	0,4325	0	0	0	0	0
P4-d₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P4-e₅	0	0	0,2985	0	0	0	0,3472	0	0,3472	0,4944	0	0,4325	0	0	0
P4-f₆	0,2482	0,0494	0,2171	0,1591	0,3311	0,1439	0,1889	0,1078	0,0974	0,3492	0,4142	0,4142	0,1889	0,4944	0,2733
P4-g₇	0	0	0	0,3831	0	0,3472	0	0,4832	0	0	0	0	0,4944	0	0
P4-h₈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4944	0	0	0
P4-i₉	0,1474	0,3472	0,2985	0,4944	0	0,4832	0	0,4694	0,4325	0,4954	0,4649	0,4325	0,4649	0,3492	0,4954
P4-j₁₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4325	0	0

RESULTADOS

continuação

fragmento	Mar NHP	Mar F7	Luso F0	Luso F2	Emparn F0	Aqua F1(1)	Aqua F1(2)	Aqua F3	Aqua F4	Aquamaris F0	Com F0(1)	Com F0(2)	Com F0(3)	UfscF2	UfscF0
P5-a ₁	0	0,4746	0,3831	0,2985	0	0	0,4325	0,3603	0,4325	0,4325	0	0	0	0,4954	0,4944
P5-b ₂	0,3382	0,3832	0,3722	0,4142	0,4747	0,3832	0,4944	0,4242	0,4416	0,1889	0,4944	0,4142	0,2733	0,4954	0,4954
P5-c ₃	0,4142	0,3832	0,0331	0,2997	0,4142	0,4142	0,2321	0,3796	0,4944	0,4954	0,4649	0,4142	0,3492	0,4944	0,4954
P5-d ₄	0,4486	0,4649	0,4995	0,4325	0	0,5000	0,5000	0,3796	0,3492	0,4325	0,4944	0,4325	0,4954	0,4142	0,4142
P5-e ₅	0,3095	0,3832	0,4944	0,4954	0	0,4832	0,4944	0,4444	0,4746	0,4325	0,4649	0,4649	0,4954	0,4954	0
P5-f ₆	0,1820	0,4944	0,4649	0,3250	0,5000	0,4416	0,4416	0	0,3125	0,4954	0,4954	0,4142	0,3492	0,4954	0,4142
P5-g ₇	0,4486	0,1439	0,1591	0,3722	0,2321	0,2321	0,3125	0,4880	0,4142	0	0,4325	0,4944	0,4649	0	0
P5-h ₈	0	0,0494	0,2985	0,4994	0,5000	0	0,2321	0	0,2733	0,1889	0,2733	0,2733	0,0974	0	0,3492
P5-i ₉	0,3382	0,1889	0,0655	0,4142	0,3311	0,4416	0,2733	0,3696	0,4142	0,4954	0,4944	0,4954	0,4142	0,4142	0
P5-j ₁₀	0,3653	0,4142	0,3722	0,3722	0,3311	0,2733	0,2733	0,2083	0	0,1889	0,4649	0,0974	0,0974	0,1889	0,1889
P5-k ₁₁	0	0	0,2985	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P5-l ₁₂	0,4992	0,4746	0,4832	0	0,4571	0	0,3472	0,4985	0,4325	0,4325	0,4325	0,4325	0	0,4954	0,4325
P5-m ₁₃	0,2157	0,2321	0,1889	0,2733	0,4747	0,3125	0,3492	0,2083	0,4416	0,4142	0,4649	0,1889	0,2733	0,3492	0,2733
P5-n ₁₄	0,4009	0,5000	0	0,4636	0,4571	0,3472	0,3472	0,4444	0,4746	0	0	0	0	0	0
P5-o ₁₅	0	0,4325	0,3831	0,3831	0,4571	0,4832	0,3492	0,4142	0,3492	0,4325	0,2733	0,4344	0,4944	0	0,4325
P6-a ₁	0	0,4746	0,3831	0,2985	0	0,4325	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P6-b ₂	0,4940	0,4142	0	0,3831	0	0	0	0	0,4325	0	0	0	0,4325	0	0,4649
P6-c ₃	0,2482	0,2733	0,1591	0,2179	0	0,4325	0,4832	0,4832	0,4832	0	0,4142	0	0,3492	0,4649	0,4649
P6-d ₄	0,3153	0,4325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4325	0
P6-e ₅	0,4009	0,4954	0,4954	0,4325	0,3311	0	0	0	0,4325	0	0,4944	0,4954	0,4954	0,4944	4325
P6-f ₆	0	0,4746	0,2985	0	0,5000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P6-g ₇	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P6-h ₈	0,2795	0,0974	0,3722	0,2179	0,5000	0,1439	0,3832	0,2083	0,3832	0,4325	0,3492	0,3492	0,1889	0,4649	0,2733
P6-i ₉	0,3653	0,1889	0,3250	0,4499	0,1208	0,4142	0,3832	0,1591	0,4142	0,3492	0,2733	0,4954	0,4954	0,1889	0,2733
Média	0,2284	0,2573	0,2527	0,2604	0,2451	0,2631	0,2259	0,2335	0,2621	0,2323	0,2340	0,2413	0,2374	0,2336	0,2261

RESULTADOS

Apesar dos resultados obtidos através da determinação dos coeficientes de similaridade genética de Jaccard não terem coincidido com os índices de diversidade genética de Nei calculados para as diferentes amostras analisadas, diferenças significativas não foram observadas entre os diversos valores obtidos, demonstrando que estes estoques apesar de estarem em estágios diferenciados de domesticação apresentam níveis de variabilidade genética próximos.

Tabela 11: Coeficientes de similaridade genética de Jaccard (S_J) e desvio padrão determinados para os 15 plantéis de reprodutores analisados.

Plantel	S_J	Desvio Padrão
Mar F7	0,6917	± 0,0657
Mar NHP	0,6830	± 0,0615
Luso F₀	0,6960	± 0,0698
Luso F₂	0,7198	± 0,0792
Emparn F₀	0,6996	± 0,0542
Aqua F₁ (1)	0,6996	± 0,0616
AquatF₁ (2)	0,7054	± 0,0584
Aqua F₃	0,6992	± 0,0625
Aqua F₄	0,6975	± 0,0649
Aquamaris F₀	0,7447	± 0,0764
Com F₀ (1)	0,6883	± 0,0489
Com F₀ (2)	0,7122	± 0,0747
Com F₀ (3)	0,6461	± 0,0718
Ufsc F₂	0,7335	± 0,0624
Ufsc F₀	0,7125	± 0,0502

As frequências gênicas observadas para cada fragmento variaram consideravelmente entre as diferentes amostras, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) para maioria dos locos analisados (tabela 12). Um fragmento de 380pb, denominado P3-k₁₁, proveniente da amplificação de DNA utilizando o oligonucleotídeo P3, foi encontrado nos plantéis Aqua F4 (32,92%), Ufsc F2 (36,75%) e Ufsc F0 (22,54%) e ausente nos demais estoques analisados.

O fragmento P2-b₂ também pareceu ser um loco pouco frequente, aparecendo nos estoques Mar NHP e Emparn F0 em frequências correspondentes, respectivamente, a 26,82% e 38,76% e nos demais plantéis analisados em frequências que variam de 0 a 21,83%, estando ausente em seis das 15 populações analisadas. Outros fragmentos também se apresentaram raros e ausentes em alguns plantéis. Os plantéis Aqua F3 e Ufsc F2 foram aqueles que apresentaram o maior número de fragmentos ausentes (quatro), sendo seguidos pelos plantéis Aqua F1 (1), Com F0 (1) e Com F0 (3), os quais apresentaram três locos com frequências iguais a zero.

O fragmento denominado p6-g7 apresentou uma frequência de 100% em todos os plantéis analisados se constituindo o único loco monomórfico para o conjunto total de indivíduos amostrado.

RESULTADOS

Tabela 12: Valores de freqüência gênica de Nei e percentagem de locos polimórficos determinados para os diferentes plantéis analisados.

fragmento	Freqüência Gênica														
	Mar NHP	Mar F7	Luso F0	Luso F2	Emparn F0	Aqua F1(1)	Aqua F1 (2)	Aqua F3	Aqua F4	Aquamaris F0	Com F0(1)	Com F0(2)	Com F0(3)	Ufsc F2	Ufsc F0
P2-a1*	0,6078	0,7764	1	0,8174	0,6464	0,6838	1	0,7643	1	0,6838	0,6838	0,6838	0,2929	1	1
P2-b2*	0,2662	0	0,0513	0,1056	0,3876	0,0513	0	0,2183	0,1633	0,0513	0	0,0513	0	0	0
P2-c3*	0,80,39	1	0,8174	0,5918	0,6464	0,6838	0,7764	0,6667	0,6838	1	1	1	0,5528	1	1
P2-d4*	0,2662	0,3292	0,0339	0,1633	0,1340	0,0513	0,1056	0,1502	0,0513	0,0513	0	0,0513	0	0	0,1056
P2-e5*	1	0,7764	1	1	1	0,7764	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P2-f6*	0,3496	0,3675	0,0691	0,0513	0,1340	0,2584	0,3292	0,0572	0,3292	0,2929	0,1633	0,1633	0,1633	0	0,2254
P2-g7	0,1229	0,4084	0,3675	0,3169	0,5000	0,3675	0,2254	0,3764	0,4523	0,5528	0,3675	0,3675	0,2929	0,3675	0,3675
P3-a1*	0,1013	0,1633	0,5170	0,4226	0,2094	0,4523	0,2284	0,0874	0,0780	0,2929	0,2929	0,5528	0,3675	0,6838	0,3675
P3-b2*	0,2404	0,6127	0,1056	0,0339	0,5000	0,3675	0,2254	0,2929	0,2584	0,2254	0,2254	0,1056	0,1056	0,1633	0,6325
P3-c3	0,1013	0,1340	0,3417	0,1437	0,2929	0,3292	0,1340	0,2929	0,1633	0,2254	0,2929	0,1633	0,1633	0,4523	0,7746
P3-d4*	0,1451	0,1340	0,1056	0,1835	0,2094	0,3292	0,4523	0,3764	0,2584	0,5528	0,2254	0,0513	0,2254	0,5528	0,4472
P3-e5*	0,2404	0,0513	0,2697	0,3945	0,6464	0,4084	0,3292	0,2546	0,4523	0,4523	0,3675	0,6838	0,2254	0,3675	0,4472
P3-f6*	0,1454	0,1633	0,1056	0,1056	0,6464	0,4084	0,2584	0,4226	0,5528	0,3675	0,2254	0,6838	0,4523	0,5528	0,5477
P3-g7*	0,0595	0,1633	0,5528	0,3417	1	0,5000	0,6838	0,1502	0,4084	1	0,5528	0,4523	0,4523	0,6838	0,5477
P3-h8*	0,1013	0,3292	0,5918	0,6838	0,5000	0,7764	0,3292	0,7643	1	0,4523	0,3675	1	0,4523	1	1
P3-i9*	1	1	1	1	0,5000	0,5528	1	0,7643	1	1	1	0,6838	1	0,6838	1
P3-j10*	0,7226	0,4523	0,6349	0,6838	0,5000	1	0,7764	1	0,2929	1	1	0,6838	1	0,6838	0,6838
P3-k11*	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3292	0	0	0	0	0,3675	0,2254
P3-l12*	1	1	0,8174	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P4-a1*	0,7226	0,6127	0,7418	1	1	0,6838	1	0,7643	1	0,6838	1	1	0,6838	1	1
P4-b2*	0,7226	0,5000	0,3945	0,5918	0,1340	0,0253	0,1633	0,1184	0,1938	0,0513	0,1633	0,2929	0,0513	0,1633	0,1633
P4-c3*	0,8039	0,7764	0,5918	0,7418	1	0,7764	1	1	1	0,6838	1	1	1	1	1
P4-d4*	1	0,7764	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P4-e5*	1	0,7764	0,8174	1	1	1	0,7764	1	0,7764	0,5528	1	0,6838	1	1	1
P4-f6	0,1451	0,1056	0,1244	0,0871	0,2094	0,0780	0,1056	0,0572	0,0513	0,2254	0,2929	0,2929	0,1056	0,5528	0,1633
P4-g7*	1	1	1	0,7418	1	0,7764	1	0,5918	1	1	1	1	0,5528	1	1
P4-h8*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5528	1	1	1
P4-i9*	0,0801	1	0,8174	0,5528	1	0,4084	1	0,3764	0,6838	0,4523	0,3675	0,6838	0,3675	0,2254	0,4523
P4-j10*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,6838	1	1

RESULTADOS

continuação

fragmento	Frequência Gênica														
	Mar NHP	Mar	Luso F0	Luso F2	Emparn F0	Aqua F1(1)	Aqua F1(2)	Aqua F3	Aqua F4	Aquamaris F0	Com F0(1)	Com F0(2)	Com F0(3)	UfscF2	UfscF0
P5-a1*	1	1	0,7418	0,8174	1	1	0,6838	0,7643	0,6838	0,6838	1	1	1	0,4523	0,5528
P5-b2	0,2155	0,2584	0,2472	0,2929	0,3876	0,2284	0,5528	0,2929	0,3292	0,1056	0,5528	0,2929	0,1633	0,4523	0,4523
P5-c3*	0,2929	0,2584	0,0168	0,1835	0,2929	0,2929	0,1340	0,2546	0,5528	0,4528	0,3675	0,2929	0,2254	0,5528	0,4523
P5-d4*	0,6603	1	0,4836	0,6838	1	0,5000	0,5000	0,2546	0,2254	0,6838	0,5528	0,6838	0,4523	0,2929	0,2929
P5-e5*	0,1914	0,5528	0,5528	0,4523	1	0,4084	0,5528	0,0333	0,6127	0,6838	0,3675	0,3675	0,4523	0,4523	1
P5-f6*	0,1013	0,1340	0,3675	0,2042	0,5000	0,3292	0,3292	1	0,1938	0,4523	0,4523	0,2929	0,2254	0,4523	0,2929
P5-g7*	0,6603	0,6127	0,0871	0,2472	0,1340	0,1340	0,1938	0,4226	0,2929	1	0,6838	0,5528	0,3675	1	1
P5-h8*	0	0,0513	0,8174	0,5170	0,5000	0	0,1340	0	0,1633	0,1056	0,1633	0,1633	0,0513	0	0,2254
P5-i9*	0,2155	0,2929	0,0339	0,2929	0,2094	0,3292	0,1633	0,2546	0,2929	0,4523	0,5528	0,4523	0,2929	0,2929	1
P5-j10	0,2404	0,3292	0,2472	0,2472	0,2094	0,1633	0,1633	0,1181	0	0,1056	0,3675	0,0513	0,0513	0,1056	0,1056
P5-k11*	1	1	0,8174	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P5-l12*	0,5196	0,6838	0,5918	1	0,6464	1	0,7764	0,4730	0,6838	0,6838	0,6838	0,6838	1	0,4523	0,6838
P5-m13	0,1229	0,5000	0,1056	0,1633	0,3876	0,1938	0,2254	0,1181	0,3292	0,2929	0,3675	0,1056	0,1633	0,2254	0,1633
P5-n14*	0,7226	1	1	0,6349	0,6464	0,7764	0,7764	0,6667	0,6127	1	1	1	1	1	1
P5-o15*	1	1	0,7418	0,7418	0,6464	0,4084	0,2254	0,2929	0,2254	0,6838	0,1633	0,5528	0,5528	1	0,6838
P6-a1*	1	1	0,7418	0,8174	1	0,6838	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P6-b2*	0,4453	0,3675	1	0,7418	1	1	1	1	0,6838	1	1	1	0,6838	1	0,3675
P6-c3*	0,1451	0,1340	0,0871	0,1244	0	0,6838	0,4084	0,5918	0,4084	1	0,2929	0	0,2254	0,3675	0,3675
P6-d4*	0,8039	0,6838	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,6838	1
P6-e5*	0,7226	0,6127	0,4523	0,6838	0,2094	1	1	1	0,6838	1	0,5528	0,4523	0,4523	0,5528	0,6838
P6-f6*	1	0,4523	0,8174	1	0,5000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P6-g7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P6-h8*	0,1679	0,1056	0,2472	0,1244	0,5000	0,0780	0,2584	0,1181	0,2584	0,6838	0,2254	0,2254	0,1056	0,3675	0,1633
P6-i9	0,2404	0,2929	0,2042	0,3417	0,0646	0,2929	0,2584	0,0871	0,2929	0,2254	0,1633	0,4523	0,4523	0,1056	0,1633
% de locos polimórficos	69,81	69,81	77,36	73,58	60,38	69,81	62,26	66,04	67,92	60,38	56,60	64,15	64,15	54,72	56,60

* diferenças significativas, com $p < 0,05$

RESULTADOS

Os valores de distância e identidade genética de Nei (tabela 13), calculados para as amostras analisadas, demonstraram uma relativa proximidade genética entre os diferentes estoques reprodutores. Estes valores variaram, respectivamente, de 0,0302 a 0,1514 e 0,8595 a 0,9702. Os plantéis Luso F0 e Luso F2, os quais possuem origens a partir de animais provenientes do centro de cultivo Eduardo Lemos e Secom, respectivamente, foram os que apresentaram o menor valor de distância genética. Por outro lado, os plantéis Emparn F0 e Mar NHP foram os que se apresentaram geneticamente mais diferenciados.

Através dos valores de identidade e distância genética, pôde-se construir o dendrograma de similaridade genética (figura 8) e estabelecer as principais relações de divergência. O dendrograma mostrou que o plantel Emparn F0 apresentou-se geneticamente mais distante dos demais, o que pode ser justificado através de sua origem, a qual provém de animais pertencentes ao centro de cultivo Tecnarão, cujos representantes não estão presentes em nenhum dos outros plantéis analisados. Os plantéis pertencentes a Compar não se apresentaram agrupados entre si, reforçando a informação de que estes plantéis foram compostos por animais provenientes de viveiros de engorda, os quais eram abastecidos por pós-larvas obtidas de diferentes laboratórios de larvicultura, incluindo a Aquatec, a qual possui os estoques que apresentaram maior similaridade genética com os pertencentes a Compar. O plantel Com F1 (3) apresentou-se agrupado ao plantel Aqua F1 (1), enquanto que o plantel Aqua F1 (2) apresentou uma relação mais estreita com o plantel Com F1 (1), e o plantel Aqua F4 com o plantel Com F1 (2).

RESULTADOS

Tabela 13: Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei calculados para os diferentes plantéis analisados.

Valores de Identidade e Diversidade Genética de Nei															
	Aqua F1 (1)	Aqua F1 (2)	Aqua F3	Aqua F4	Aquamaris F0	Com F0 (1)	Com F0	Com F0 (3)	Ufsc F2	Ufsc F0	Emparn F0	Mar F7	Mar NHP	Luso F2	Luso F0
Aqua F1 (1)	****	0,9581	0,9663	0,9426	0,9369	0,9581	0,9437	0,9670	0,9148	0,9156	0,9029	0,8889	0,9078	0,9231	0,9511
Aqua F1 (2)	0,0428	****	0,9468	0,9618	0,9385	0,9676	0,9396	0,9436	0,9077	0,9213	0,9276	0,9126	0,9073	0,9481	0,9539
Aqua F3	0,0343	0,0547	****	0,9415	0,9211	0,9555	0,9228	0,9452	0,9210	0,9152	0,8805	0,8687	0,9107	0,9063	0,9292
Aqua F4	0,0591	0,0389	0,0602	****	0,9117	0,9428	0,9507	0,9339	0,9259	0,9527	0,9185	0,8994	0,9009	0,9250	0,9466
Aquamaris F0	0,0652	0,0635	0,0822	0,0925	****	0,9507	0,9166	0,9207	0,9367	0,9344	0,8864	0,8824	0,8898	0,8941	0,8991
Com F0 (1)	0,0428	0,0330	0,0455	0,0589	0,0506	****	0,9635	0,9674	0,9425	0,9476	0,9214	0,9136	0,9362	0,9351	0,9509
Com F0 (2)	0,0579	0,0623	0,0804	0,0506	0,0871	0,0372	****	0,9535	0,9444	0,9392	0,9356	0,9083	0,9117	0,9396	0,9536
Com F0 (3)	0,0335	0,0580	0,0564	0,0684	0,0826	0,0332	0,0477	****	0,9093	0,9199	0,9061	0,9123	0,9419	0,9289	0,9622
Ufsc F2	0,0890	0,0969	0,0823	0,0770	0,0654	0,0592	0,0572	0,0951	****	0,9589	0,8822	0,8659	0,8914	0,9026	0,9071
Ufsc F0	0,0882	0,0820	0,0886	0,0485	0,0678	0,0538	0,0627	0,0835	0,0420	****	0,8839	0,8973	0,8967	0,8949	0,9241
Emparn F0	0,1021	0,0752	0,1273	0,0850	0,1206	0,0818	0,0666	0,0986	0,1254	0,1235	****	0,9014	0,8595	0,9316	0,9204
Mar F7	0,1178	0,0915	0,1407	0,1060	0,1252	0,0904	0,0961	0,0918	0,1440	0,1083	0,1038	****	0,9460	0,9148	0,9271
Mar NHP	0,0967	0,0973	0,936	0,1044	0,1168	0,0660	0,0924	0,0598	0,1149	0,1090	0,1514	0,0555	****	0,9055	0,9485
Luso F2	0,0800	0,0533	0,984	0,0780	0,1120	0,0671	0,0623	0,0738	0,1025	0,1111	0,0708	0,0891	0,0993	****	0,9702
Luso F0	0,0501	0,0472	0,735	0,0549	0,1063	0,0504	0,0475	0,0386	0,0975	0,0789	0,0830	0,0757	0,0528	0,0302	****

RESULTADOS

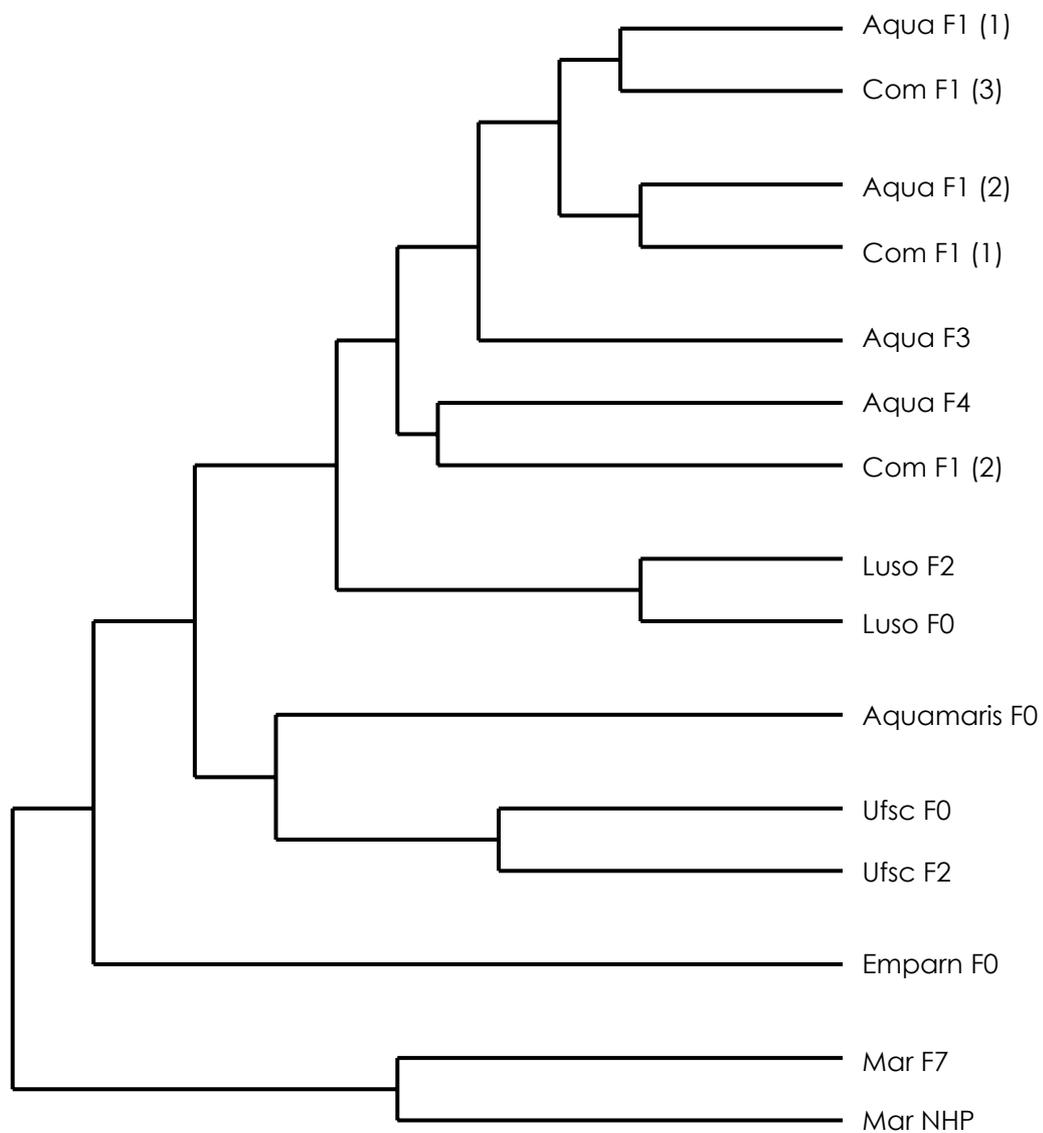


Figura 8: Dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA, construído com base nos valores de distância e identidade genética de Nei obtidos para os diferentes plantéis analisados.

4.2.2. Verificação de Perda de Variabilidade Genética ao Longo de Cinco Gerações Endocruzadas Produzidas em Cativeiro

Para verificação de redução dos níveis de variação genética na linhagem endocruzada foram analisados um total de 100 indivíduos pertencentes às gerações F5, F6, F7, F8, e F9. De um total de 64 fragmentos identificados, através da utilização dos *primers* 1, 2, 3, 4, 5 e 6 em reações de PCR, 87,50% apresentaram-se polimórficos para o conjunto de amostras analisado (tabela 14). A geração F9 foi a que apresentou o menor número de locos polimórficos, enquanto a geração F5 apresentou o maior número. Os *primers* 1 e 3, foram os que apresentaram, respectivamente, o menor e maior grau de polimorfismo entre as diversas amostras analisadas. Do total de bandas consideradas para o *primer* 1, aproximadamente, 51% delas apresentaram-se polimórficas. O *primer* 4 também apresentou um baixo nível de polimorfismo. Já o *primer* 3, demonstrou-se altamente polimórfico, com 87%, do total de bandas analisadas, consideradas polimórficas para as cinco gerações avaliadas.

Tabela 14: Total de locos analisados, número e percentagem de locos polimórficos por *primer* em cada geração analisada.

<i>Primer</i>	Nº total de locos	% de locos polimórficos	Nº total de locos polimórficos por geração				
			Gerações				
			F5	F6	F7	F8	F9
1	11	51	06	06	06	05	05
2	07	69	06	05	05	05	03
3	12	87	10	11	09	11	11
4	10	52	05	05	06	06	04
5	15	75	14	13	10	10	09
6	09	58	08	06	07	07	03
Total	64	87,50	49	46	43	44	35

RESULTADOS

Os coeficientes de similaridade de Jaccard calculados para os plantéis estudados revelaram um sensível aumento nos níveis de similaridade genética ao longo das cinco gerações analisadas (tabela 15), evidenciando diferenças altamente significativas ($p < 0,05$) quando se comparou os valores obtidos para as gerações F5 e F9, através do teste de Mann Whitney.

Tabela 15: Coeficientes de similaridade genética de Jaccard determinados para os plantéis em F5, F6, F7, F8 e F9.

Coeficiente de Similaridade de Jaccard					
Primer	F5	F6	F7	F8	F9
1	0.711	0.751	0.749	0.831	0.842
2	0.662	0.673	0.721	0.796	0.739
3	0.457	0.468	0.545	0.656	0.674
4	0.834	0.877	0.860	0.885	0.912
5	0.529	0.597	0.695	0.676	0.763
6	0.598	0.639	0.640	0.749	0.874
TOTAL	0.621	0.662	0.701	0.749	0.795

Os valores de diversidade genética também sugeriram haver uma maior homogeneidade genética entre os indivíduos pertencentes às gerações mais avançadas. A heterozigosidade média diminuiu de 0,2673 na geração F5 para 0,2158 na geração F9 (tabela 16).

RESULTADOS

Tabela 16: Valores de diversidade genética de Nei calculados para as cinco gerações endocruzadas.

Fragmentos		Diversidade Genética de Nei				
locos	pb	F5	F6	F7	F8	F9
P1-a₁	700	0,1889	0,2321	0,3492	0,2733	0,4142
P1-b₂	670	0,4416	0,3125	0,3492	0,4832	0,4944
P1-c₃	650	0	0	0	0	0
P1-d₄	560	0	0	0	0	0
P1-e₅	530	0	0	0	0	0
P1-f₆	500	0,3125	0,1439	0,4832	0	0,5000
P1-g₇	430	0,3832	0,3125	0,0974	0,4746	0,4944
P1-h₈	410	0,3492	0,3125	0,1439	0,2733	0,3472
P1-i₉	400	0,4944	0,3472	0,4325	0,3472	0
P1-j₁₀	360	0	0	0	0	0
P1-k₁₁	300	0	0	0	0	0
P2-a₁	710	0,3472	0,3472	0,3472	0,3472	0
P2-b₂	700	0,1439	0,3832	0	0,0494	0
P2-c₃	660	0,3472	0	0	0	0
P2-d₄	640	0,3832	0,1889	0,4416	0,2321	0,2733
P2-e₅	550	0	0	0,3472	0	0
P2-f₆	530	0,3832	0,4142	0,4649	0,4142	0,4954
P2-g₇	500	0,4954	0,4832	0,4832	0,3472	0,3492
P3-a₁	900	0,3832	0,4142	0,2733	0,2321	0,3932
P3-b₂	850	0,1439	0,2733	0,4746	0,0974	0,4142
P3-c₃	700	0,4142	0,3492	0,2321	0,4416	0,3125
P3-d₄	660	0,2321	0,2733	0,2321	0,494	0,4416
P3-e₅	650	0,3125	0,0974	0,0974	0,4944	0,4142
P3-f₆	640	0,3832	0,1889	0,2733	0,4142	0,4944
P3-g₇	510	0,4954	0,3832	0,2733	0,3832	0,4325
P3-h₈	500	0,3832	0,5000	0,4416	0	0,4944
P3-i₉	450	0	0	0	0,3472	0,4325
P3-j₁₀	410	0,3492	0,4832	0,4954	0,4325	0,3472
P3-k₁₁	380	0,3492	0,2733	0	0,4746	0,4325
P3-l₁₂	340	0	0,3472	0	0,3472	0
P4-a₁	900	0,4954	0,4325	0,4746	0,3472	0,4746
P4-b₂	840	0,1439	0,5000	0,5000	0	0
P4-c₃	600	0,4832	0,3472	0,3472	0,4325	0,3472
P4-d₄	520	0	0	0,3472	0,3472	0,3472
P4-e₅	430	0	0	0,3472	0,3472	0
P4-f₆	400	0,0494	0,2321	0,1889	0,2321	0,1439
P4-g₇	350	0	0,3472	0	0,4325	0
P4-h₈	290	0	0	0	0	0
P4-i₉	270	0,3472	0	0	0	0
P4-j₁₀	220	0	0	0	0	0
P5-a₁	850	0,4746	0,5000	0	0	0
P5-b₂	800	0,3832	0,4142	0,3832	0,4416	0,1439
P5-c₃	700	0,3832	0,4142	0,3832	0,2733	0
P5-d₄	660	0,4649	0,4944	0	0,5000	0,4954
P5-e₅	620	0,3832	0,4944	0,4944	0	0
P5-f₆	540	0,4944	0,1439	0,2321	0,3125	0,2321
P5-g₇	510	0,1439	0,4736	0,4746	0,3472	0,4649
P5-h₈	500	0,0494	0,2321	0,0974	0,4649	0,4954
P5-i₉	490	0,1889	0,4954	0,4142	0,4954	0
P5-j₁₀	470	0,4142	0,4832	0,4416	0,4954	0,1889
P5-k₁₁	430	0	0	0	0	0
P5-l₁₂	390	0,4746	0,3472	0,4325	0,4832	0,4325
P5-m₁₃	360	0,2321	0,3492	0,5000	0,4142	0,4142
P5-n₁₄	310	0,5000	0,4832	0	0	0,3472
P5-o₁₅	290	0,4325	0	0	0	0
P6-a₁	800	0,4746	0	0	0	0
P6-b₂	660	0,4142	0,4746	0,4649	0,4325	0
P6-c₃	630	0,2733	0,3492	0,2321	0,4832	0,5000
P6-d₄	600	0,4325	0	0,4325	0	0
P6-e₅	530	0,4954	0,2321	0,4746	0,3472	0
P6-f₆	500	0,4746	0,4649	0,4954	0,4325	0
P6-g₇	470	0	0	0	0,3472	0
P6-h₈	460	0,0974	0,4142	0,1889	0,3832	0,3832
P6-i₉	420	0,1889	0,3832	0,4142	0,4416	0,4325
Média		0,2673	0,2588	0,2421	0,2530	0,2158

A análise das freqüências gênicas demonstrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) para a maioria dos fragmentos analisados determinadas através do teste de homogeneidade que se baseia na análise de qui-quadrado (tabela 17). Uma tendência geral a oscilações nas freqüências gênicas foi observada para a maioria dos locos polimórficos. Entretanto, muitos locos apresentaram uma diminuição ou aumento progressivos nas suas freqüências, conforme aumento no número de gerações.

Os fragmentos P2-a₁, P2-c₃, P3-j₁₀, P4-i₉, P5-e₅, P5-o₁₅, P6-i₉ e P6-a₁ demonstraram um aumento crescente ao longo das cinco gerações analisadas, tendendo para uma maior homogeneização entre os indivíduos pertencentes às gerações mais avançadas. Os locos P3-i₉ e P4-d₄, tiveram suas freqüências sensivelmente diminuídas, sendo que o fragmento P4-b₂, presente em aproximadamente 80% e 50% dos indivíduos das gerações F5 e, F6 e F7, respectivamente, passou a não mais existir nas gerações F8 e F9.

Alguns locos tiveram suas freqüências drasticamente reduzidas na geração F9, estando presentes em menos de 8% dos indivíduos pertencentes a este plantel. Dois fragmentos, denominados P2-b₂ e P3-k₁₁, que não aparecem na geração F7, retornaram, no entanto, a aparecer na geração F8 e nas gerações F8 e F9, respectivamente, podendo refletir um possível erro amostral. A geração F5 foi a que apresentou a maior percentagem de locos polimórficos (~77%), enquanto a geração F9 apresentou o menor grau de polimorfismo observado entre as cinco gerações analisadas (~55%)

RESULTADOS

Tabela 17: Valores de freqüência gênica, percentagem de locos polimórficos e teste de homogeneidade baseado na determinação do qui-quadrado (χ^2) e na probabilidade (p) de erro, com $*p < 0,05$.

Fragmentos		Freqüência Gênica (f)					Teste de homogeneidade		
locos	pb	F5	F6	F7	F8	F9	χ^2	p	GL
P1-a ₁	700	0,1056	0,1340	0,2254	0,1633	0,2929	03,014	0,5554	4
P1-b ₂	670	0,3292	0,1938	0,2254	0,4084	0,5528	07,517	0,1109	4
P1-c ₃	650	1	1	1	1	1	0	1	4
P1-d ₄	560	1	1	1	1	1	0	1	4
P1-e ₅	530	1	1	1	1	1	0	1	4
P1-f ₆	500	0,1938	0,7800	0,4084	1	0,5000	41,459	0*	4
P1-g ₇	430	0,2584	0,1938	0,5130	0,6127	0,5528	20,761	0,00035*	4
P1-h ₈	410	0,2254	0,1938	0,7800	0,1633	0,7764	30,366	0,000004*	4
P1-i ₉	400	0,5528	0,7764	0,6838	0,7764	1	11,647	0,0201*	4
P1-j ₁₀	360	1	1	1	1	1	0	1	4
P1-k ₁₁	300	1	1	1	1	1	0	1	4
P2-a ₁	710	0,7764	0,7764	0,7764	0,7764	1	5,446	0,2445	4
P2-b ₂	700	0,7800	0,2584	0	0,0253	0	14,101	0,0070*	4
P2-c ₃	660	0,7764	1	1	1	1	18,726	0,0009*	4
P2-d ₄	640	0,2584	0,1056	0,3292	0,1340	0,1633	4,368	0,358	4
P2-e ₅	550	1	1	0,7764	1	1	8,726	0,0009*	4
P2-f ₆	530	0,2584	0,2929	0,3675	0,2929	0,4523	02,180	0,7026	4
P2-g ₇	500	0,4523	0,4084	0,4084	0,7764	0,2254	12,937	0,0116*	4
P3-a ₁	900	0,2584	0,2929	0,1633	0,1340	0,2584	02,188	0,7011	4
P3-b ₂	850	0,7800	0,1633	0,6127	0,0513	0,2929	22,984	0,0001*	4
P3-c ₃	700	0,2929	0,2254	0,1340	0,3292	0,1938	2,694	0,610	4
P3-d ₄	660	0,1340	0,1633	0,1340	0,0253	0,3292	7,260	0,123	4
P3-e ₅	650	0,1938	0,5130	0,5130	0,5528	0,2929	19,666	0,0006*	4
P3-f ₆	640	0,2584	0,1056	0,1633	0,2929	0,5528	11,942	0,0178*	4
P3-g ₇	510	0,4523	0,2584	0,1633	0,2584	0,6838	14,926	0,0049*	4
P3-h ₈	500	0,2584	0,5000	0,3292	1	0,5528	26,998	0*	4
P3-i ₉	450	1	1	1	0,7764	0,6838	19,046	0,0008*	4
P3-j ₁₀	410	0,2254	0,4084	0,4523	0,6838	0,7764	15,670	0,0035*	4
P3-k ₁₁	380	0,2254	0,1633	0	0,6127	0,6838	31,546	0,000002*	4
P3-l ₁₂	340	1	0,7764	1	0,7764	1	14,734	0,00528*	4
P4-a ₁	900	0,4523	0,6838	0,6127	0,7764	0,6127	04,833	0,3049	4
P4-b ₂	840	0,7800	0,5000	0,5000	0	0	32,362	0,000002*	4
P4-c ₃	600	0,4084	0,7764	0,7764	0,6838	0,7764	9,403	0,0518	4
P4-d ₄	520	1	1	0,7764	0,7764	0,7764	10,330	0,0352*	4
P4-e ₅	430	1	1	0,7764	0,7764	1	14,734	0,0053*	4
P4-f ₆	400	0,2530	0,1340	0,1056	0,1340	0,0780	01,922	0,750	4
P4-g ₇	350	1	0,7764	1	0,6838	1	19,046	0,00081*	4
P4-h ₈	290	1	1	1	1	1	0	1	4
P4-i ₉	270	0,7764	1	1	1	1	18,726	0,0009*	4
P4-j ₁₀	220	1	1	1	1	1	0	1	4
P5-a ₁	850	0,6127	0,5000	1	1	1	33,232	0*	4
P5-b ₂	800	0,2584	0,2929	0,2584	0,3292	0,0780	4,084	0,395	4
P5-c ₃	700	0,2584	0,2929	0,2584	0,1633	1	39,135	0*	4
P5-d ₄	660	0,3675	0,5528	1	0,5000	0,4523	20,032	0,0005*	4
P5-e ₅	620	0,2584	0,5528	0,5528	1	1	37,672	0*	4
P5-f ₆	540	0,5528	0,7800	0,1340	0,1938	0,1340	17,146	0,002*	4
P5-g ₇	510	0,7800	0,6127	0,6127	0,7764	0,3675	23,757	0,00009*	4
P5-h ₈	500	0,2530	0,1314	0,5130	0,3675	0,4523	18,153	0,0011*	4
P5-i ₉	490	0,1056	0,4523	0,2929	0,4523	1	35,843	0*	4
P5-j ₁₀	470	0,2929	0,4084	0,3292	0,4523	0,1056	06,651	0,1555	4
P5-k ₁₁	430	1	1	1	1	1	0	1	4
P5-l ₁₂	390	0,6127	0,7764	0,6838	0,4084	0,6838	6,593	0,159	4
P5-m ₁₃	360	0,1340	0,2254	0,5000	0,2929	0,2929	7,069	0,132	4
P5-n ₁₄	310	0,5000	0,4084	1	1	0,7764	31,368	0,000003*	4
P5-o ₁₅	290	0,6838	1	1	1	1	27,006	0,00002*	4
P6-a ₁	800	0,6127	1	1	1	1	33,585	0,000001*	4
P6-b ₂	660	0,2929	0,6127	0,3675	0,6838	1	26,084	0,00003*	4
P6-c ₃	630	0,1633	0,2254	0,1340	0,4084	0,5000	10,044	0,0397*	4
P6-d ₄	600	0,6838	1	0,6838	1	1	21,721	0,0002*	4
P6-e ₅	530	0,4523	0,1340	0,6127	0,7764	1	35,7032	0*	4
P6-f ₆	500	0,6127	0,3675	0,4523	0,6838	1	20,471	0,0004*	4
P6-g ₇	470	1	1	1	0,7764	1	18,726	0,0009*	4
P6-h ₈	460	0,5130	0,2929	0,1056	0,2584	0,2584	5,931	0,2043	4
P6-i ₉	420	0,1056	0,2584	0,2929	0,3292	0,6838	16,360	0,0026*	4
Percentagem de locos polimórficos		76,56	71,88	67,19	68,75	54,69			

RESULTADOS

Os resultados obtidos com base na análise de divergência genética realizada para as amostras analisadas demonstraram níveis de distância e identidade genéticas diferenciados entre as linhagens (tabela 18). As gerações F5 e F6 e as F6 e F7 foram as que apresentaram os maiores valores de identidade genética. As gerações F5 e F9, por sua vez, evidenciaram os maiores níveis de distância genética.

O dendrograma obtido demonstrou que à medida que a geração avança, esta vai modificando sua estrutura genética e se distanciando cada vez mais das populações iniciais (figura 9).

Tabela 18: Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei estabelecidos para as diferentes gerações analisadas.

Distância e Identidade Genética de Nei					
gerações	F5	F6	F7	F8	F9
F5	*****	0,9568	0,9416	0,8938	0,8706
F6	0,0442	*****	0,9623	0,9192	0,8907
F7	0,0601	0,0384	*****	0,9218	0,8855
F8	0,1123	0,0843	0,0814	*****	0,9263
F9	0,1386	0,1158	0,1216	0,0766	*****

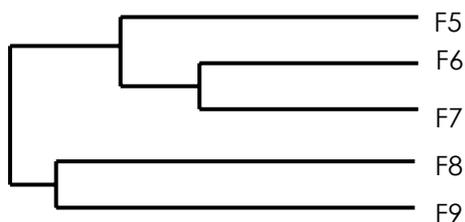


Figura 9: Dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA, construído com base nos valores de distância genética de Nei obtidos para as gerações F5, F6, F7, F8 e F9.

RESULTADOS

A análise de regressão não-linear, relacionando os valores de similaridade genética de Jaccard, obtidos para as cinco linhagens endocruzadas, com as suas respectivas gerações, demonstrou que conforme o número de gerações avança o nível de similaridade genética média observada entre os indivíduos, considerando o conjunto total de locos analisados, tende a aumentar e atingir valores próximos a um. Segundo os valores obtidos, caso esta tendência seja mantida, os níveis de variação genética desse plantel poderão assumir valores próximos a zero, antes mesmo deste atingir a 19ª geração (Figura 10).

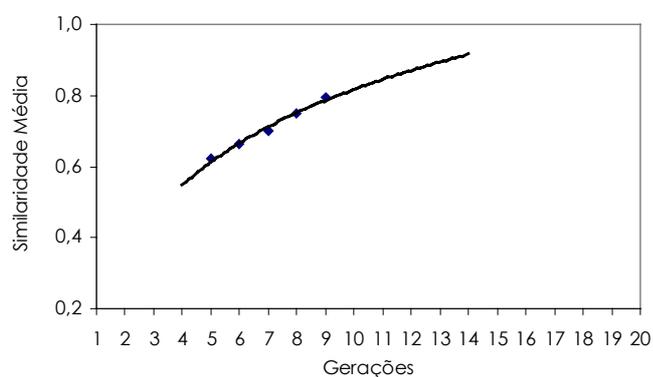


Figura 10: Gráfico de regressão não-linear determinado a partir dos valores de similaridade genética de Jaccard versus o número de gerações de cada linhagem analisada.

De acordo com os valores de variância e coeficiente de variação, considerando os coeficientes de similaridade média de Jaccard determinados para cada *primer* separadamente (tabela 19), a diminuição na amplitude de variação entre estes valores encontra-se intimamente relacionada com o

aumento do número de gerações. A análise de regressão realizada a partir desses dados também evidenciou uma tendência geral ao aumento da homogeneidade genética entre indivíduos pertencentes às gerações mais avançadas. A resposta de cada primer analisado individualmente torna-se mais homogênea à medida que a geração aumenta (figura 11).

Tabela 19: Valores de variância, desvio padrão médio e coeficiente de variação para os coeficientes de similaridade genética de Jaccard obtidos para os *primers* 1, 2, 3, 4 e 5 analisados separadamente.

Valores considerando cada <i>primer</i> separadamente			
Geração	Variância	Desvio Padrão	Coeficiente de variação
F5	0,0181	0,1345	21,28
F6	0,0193	0,1388	20,80
F7	0,0112	0,1056	15,05
F8	0,0080	0,0893	11,67
F9	0,0082	0,0903	11,28

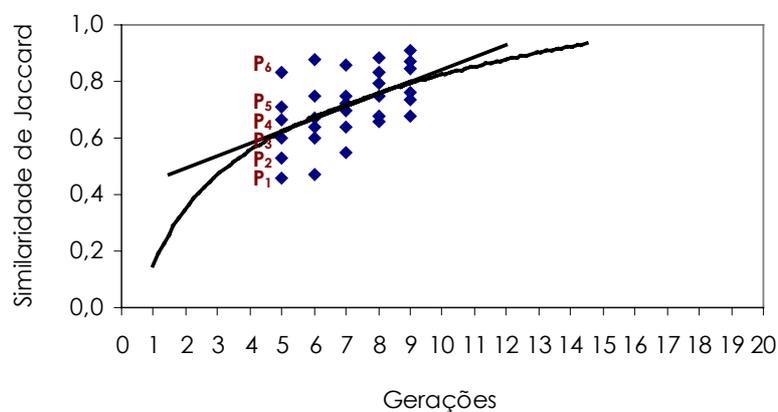


Figura 11: Gráfico de regressão determinado a partir dos valores de similaridade genética obtidos para os *primers* P1, P2, P3, P4, P5 e P6 versus o número de gerações de cada linhagem analisada.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Estimativas de relações genéticas entre linhagens, populações ou cruzantes, através da determinação de populações geneticamente únicas e da quantificação da magnitude das diferenças genéticas entre um conjunto de populações consideradas, parece ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de programas de manejo (Barker, 1994). O estudo da diversidade genética pode auxiliar na identificação de estoques geneticamente diferenciados, verificando a ocorrência de populações selecionadas e adaptadas a diferentes condições ambientais (Fuchs *et al.*, 1998). Níveis de heterozigosidade distintos entre populações podem refletir suas respectivas histórias de *bottleneck* (Barker, 1994), podendo os baixos níveis de variação genética estar relacionados com a propagação repetida e a manutenção, por um longo período de tempo, de um limitado número de indivíduos amostrado de populações selvagens, indicando, ainda, a ocorrência de um possível aumento nas taxas de endocruzamento em estoques cativos (Barman *et al.*, 2003).

No presente trabalho, os dados obtidos para plantéis em gerações iniciais (F0 e F1) evidenciaram indivíduos geneticamente muito homogêneos, sugerindo haver uma suposta redução inicial na variabilidade genética nesses plantéis. Estes resultados sugerem que um forte efeito fundador ou de deriva genética estaria promovendo um estrangulamento inicial, com perdas efetivas de variação genética. Além disso, uma pequena amplitude de variação foi observada entre os níveis de diversidade e similaridade genética

determinados para plantéis em fases de domesticação diferenciadas. Os plantéis Mar F7 e Mar NHP, formados a partir de uma base genética mais ampla, incluindo animais selvagens de diferentes origens, embora em sétima geração, apresentaram níveis de variação genética equivalentes a plantéis em gerações mais iniciais. Da mesma forma, o plantel Aqua F4, originado a partir de três diferentes procedências, apresentou uma menor homogeneidade genética em relação a outros plantéis em fase de domesticação menos avançada. Apesar do efeito de deriva parecer ser o principal causador dos baixos níveis de variação observados nestas populações, prováveis efeitos de endocruzamentos, no entanto, não devem ser descartados.

O tipo de manejo atualmente realizado pelos laboratórios de larvicultura para abertura e manutenção dos estoques reprodutores de *L. vannamei* no Brasil contribui para o aumento na taxa de endocruzamentos dos plantéis, com conseqüente redução dos níveis de diversidade genética dessas populações. O reduzido número de reprodutores, a utilização de animais nascidos em cativeiro e o método de seleção baseado exclusivamente na observação fenotípica dos indivíduos propiciam o aumento da similaridade genética das populações cativas.

Para populações naturais, a redução da diversidade genética pode ser primeiramente expressa em termos de perda de cruzantes e/ou variedades. Enquanto a perda de variação dentro de populações é continuamente atenuada através da introdução de novas variações decorrentes de mutação, a variação genética presente como diferenças

entre linhagens ou populações não pode ser regenerada. Em populações cativas, esta perda decorre principalmente dos processos de deriva e endocruzamento. Cada linhagem ou grupo de reprodutor é o produto de processos aleatórios de deriva genética, bem como de adaptação, determinados por diferentes pressões de seleção impostas pelo clima, existência de parasitas endêmicos e doenças, aspectos relacionados a nutrição e outros critérios estabelecidos pelo homem. Cada população possui uma combinação única de genes que pode divergir sua estrutura genética em relação a outras populações, as quais encontram-se reprodutivamente isoladas (Franklin, 1981; Hill e Keightley, 1988; Barker, 1994).

A análise do dendograma de similaridade genética, determinado para os 15 plantéis analisados, com base nos resultados de distância e identidade genética obtidos, demonstrou que, de uma maneira geral, há uma tendência maior para estoques que possuem origens em comum agruparem-se entre si. Entretanto, exceções foram observadas, principalmente, para plantéis formados a partir de pós-larvas provenientes de viveiros de engorda, as quais, em geral, provêm de diferentes centros de cultivo. Apesar dos plantéis terem apresentado altos níveis de identidade genética, as relações genéticas estabelecidas entre eles poderão auxiliar na fundação de novos estoques reprodutores. A utilização de animais geneticamente menos relacionados e um maior número de indivíduos utilizados como reprodutores poderá promover um ligeiro aumento nos níveis de variação genética dos novos plantéis fundados, atenuando possíveis efeitos negativos decorrentes de deriva e/ou aumento na taxa de endocruzamentos.

Muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar os prováveis efeitos que tais fenômenos podem ocasionar em uma população. Em peixes do gênero *Poeciliopsis*, estoques geneticamente mais homozigotos apresentaram um decréscimo nas taxas de fertilidade e crescimento e um aumento na taxa de mortalidade em relação a estoques mais heterozigotos (Vrijenhoek, 1989). Populações de guepardos da África do Sul demonstraram grande dificuldade de cruzamento em cativeiro, apresentando altas taxas de anormalidades de espermatozóides e de mortalidade em indivíduos juvenis, decorrentes do reduzido nível de variabilidade genética, provavelmente, ocasionado por um drástico efeito de deriva ocorrido em um passado recente (O'Brien *et al.*, 1985). Relações entre níveis de diversidade genética *versus* performance reprodutiva também foram relatadas para peixes da espécie *Brycon lundii* pertencentes a diferentes populações do rio São Francisco, as quais apresentaram-se geneticamente diferenciadas (Wasko e Galetti, 2002).

Uma das grandes contribuições dos estudos genéticos de espécies aquáticas economicamente exploradas tem sido a identificação de grupos de indivíduos ou unidades cruzantes, também conhecidos como estoques (Thorpe *et al.*, 2000). Esta abordagem tem merecido especial relevância entre a comunidade científica, uma vez que, a existência de populações diferenciadas necessita de estratégias de manejo distintas, seja para sua conservação ou para sua utilização em práticas na aqüicultura. Esforços têm sido empenhados para determinação de estruturação em populações de diferentes espécies de peixes (Hatanaka e Galetti, 2003) e camarões (Lester e Pante, 1992; Benzie 2000).

A existência de diferenciação entre populações pode ser avaliada através da constatação de mudanças significativas nas freqüências gênicas, as quais podem divergir linhagens para diferentes características de performance. Em ostras, entretanto, estudos realizados em uma linhagem de *Saccostrea glomerata*, selecionada para aumento de peso total através do método de seleção massal, demonstraram alto grau de variabilidade genética em estoques na segunda e terceira gerações, não evidenciando, no entanto, diferenças significativas nas freqüências alélicas destes estoques quando comparados entre si e com um grupo controle na primeira geração (English *et al.*, 2001). Em carpas, análises de RAPD foram realizadas com o objetivo de detectar a base molecular da heterose em três variedades. Os valores de similaridade e distância genética demonstraram níveis diferenciados entre as populações analisadas, sugerindo haver uma maior heterose entre populações geneticamente mais distantes (Dong e Zhou, 1998). Por outro lado, marcadores de RAPD e microssatélite evidenciaram ausência de diversidade entre a estrutura genética de dois estoques reprodutores cultivados na Hungria, os quais apresentaram valores de freqüência alélica e heterozigosidade muito similares (Bártfai *et al.*, 2003).

A análise de distribuição de freqüências gênicas, determinada para as cinco gerações aqui estudadas, evidenciou diferenças significativas para a maioria dos locos considerados, dando indícios de que o processo de seleção de reprodutores pode promover alterações nas freqüências e nos níveis de diversidade gênica das gerações subseqüentes produzidas em cativeiro.

Apesar de não ter sido constatado, até o momento, nenhuma perda de performance, relacionada a taxas de crescimento e de fecundidade, os níveis de variabilidade genética deste plantel devem ser preservados para que estes não conduzam a uma deteriorização na saúde genética dos animais. A drástica redução nos níveis de variabilidade genética dessa população pode conduzir a uma perda efetiva de um grande número de alelos nas gerações seguintes, como verificado para o fragmento P4-b₂, ausente nas gerações F8 e F9.

Sunden e Davis (1991), analisando populações de *L. vannamei* detectaram uma maior perda de alelos e uma menor heterozigosidade em linhagens cativas quando comparadas com populações selvagens. As populações domesticadas apresentaram perda de até 12 alelos, sem ocorrência de alelos únicos. Segundo os autores, a diminuição na heterozigosidade e a perda de alelos devem ser monitoradas como um indicador potencial de variação genética para características de importância econômica, caso a seleção para caracteres se comporte de maneira similar ao padrão de seleção de marcas neutras. Esta perda pode ser um importante aspecto para o estabelecimento de estratégias de seleção de estoques reprodutores, devendo-se evitar a escolha de populações que apresentem alta frequência de perda de alelos.

Em *L. stylirostris*, análises aloenzimáticas realizadas em populações cultivadas e selvagens do Golfo da Califórnia, apesar de evidenciarem uma maior perda de alelos nas linhagens cativas, não demonstraram diferenças significativas entre os níveis de heterozigosidade genética e frequências

alélicas, evidenciando, no entanto, um déficit de heterozigose para a maioria dos locos analisados. Um maior desequilíbrio de ligação foi observado para os estoques cultivados, os quais sugeriram a existência de uma recente redução no tamanho efetivo das populações. Além disso, discrepâncias observadas entre duas das linhagens cultivadas apontaram para prováveis efeitos fundadores e de deriva, uma vez que ambas as populações possuíam origem comum (Jamos-Paredes e Grijalva-Chon, 2003). Tais efeitos já tinham sido verificados em populações de *M. japonicus*, as quais revelaram uma constante redução nos níveis de polimorfismo aloenzimático ao longo de seis gerações mantidas em cativeiro, passando de 0,102 na geração F1 para 0,039 na geração F6. Um "gargalo" inicial, ocorrido logo na primeira geração, teria contribuído para a drástica redução nos níveis de variação genética observada nas gerações subseqüentes. Embora o número de reprodutores utilizados para originar a geração posterior variasse de 50 a 300 indivíduos, este estudo revelou que o número efetivo de reprodutores deveria corresponder a menos de quatro casais (Sbordoni *et al.*, 1986).

Os coeficientes de Jaccard aqui calculados para as cinco gerações subseqüentes de um plantel de reprodutores também demonstraram estar havendo uma perda de variação genética a cada nova geração. Além disso, uma menor diversidade genética foi observada para as gerações mais adiantadas.

Este plantel, fundado a partir da obtenção de animais importados de diferentes países, vem passando por um processo de domesticação que atualmente já ultrapassa a geração F9. Apesar do manejo inicial ter

contribuído para promover uma maior diversificação da base genética da população fundadora (considerada F0), durante todo este período a introdução de novos *pools* gênicos não ocorreu, propiciando o aumento na taxa de endocruzamentos e, conseqüentemente, nos níveis de consangüinidade das gerações subseqüentes. A análise de regressão não-linear demonstrou que caso esta tendência seja mantida em menos de dez gerações os níveis de variação genética deste plantel poderão atingir valores próximos a zero.

Apesar do endocruzamento representar um risco em potencial para a produtividade, linhagens endocruzadas podem, no entanto, se constituir numa estratégia de manejo interessante. Sob o ponto de vista de melhoramento genético, o desenvolvimento de linhagens endogâmicas divergentes pode ser uma característica bastante vantajosa, se conduzido de maneira eficiente. O endocruzamento pode aumentar a expressão de variância genética que é avaliada para seleção neutra, podendo, aparentemente, converter variações ordinariamente mascaradas pela dominância e epistasia dentro de variância aditiva, com aumento da variância dentro e entre linhagens inter cruzadas (Robertson, 1952; Goodnight, 1988). Ocasionalmente se sugere que endocruzamentos devam ser utilizados como uma ferramenta de gerenciamento, uma vez que estes podem contribuir para origem e manutenção de correlações entre locos. Programas de endocruzamentos parecem, no entanto, uma estratégia de risco, uma vez que em geral ocorre perda de variação e valor adaptativo (Weir, 1972).

A prática da endogamia pode também ser utilizada com uma finalidade "purgatória", na qual genes indesejáveis podem vir a ser eliminados da população. Nestes casos, as gerações subseqüentes devem apresentar ganhos de produtividade (performance), podendo ser mantidas indefinidamente até alcançar níveis de endogamia próximos a um. Estas linhagens, teoricamente, devem incluir a maioria de indivíduos homozigotos, demonstrando, no entanto, baixos níveis de depressão endogâmica. Programas de melhoramento em aves e suínos têm utilizado a endogamia com bastante sucesso (Falconer, 1981; Bowman, 1981). Templeton e Read (1993) planejaram um programa de endocruzamento para expor mutações recessivas deletérias, entretanto, eles justificaram o plano somente como um método de último recurso para um estoque geneticamente debilitado, uma vez que, apesar de populações cativas sobreviverem à purgação seletiva e manifestações de depressão endogâmica, estas podem ser reduzidas a não mais que um estoque domesticado.

No Brasil, há uma forte tendência tecnológica atual para o estabelecimento de programas de melhoramento genético na espécie *L. vannamei*, através do desenvolvimento de diferentes linhagens selecionadas principalmente para crescimento, resistência a doenças ou livres de patógenos específicos (ABCC, 2002). Entretanto, tal abordagem deve se consolidar juntamente com o fortalecimento de tecnologias de manejo que não só aumentem a produtividade e reduzam os custos de produção, mas também que diminuam os impactos sobre o meio ambiente e garantam a saúde genética dos estoques cultivados. Os resultados obtidos no presente trabalho

seguramente contribuirão para o melhor aproveitamento da base genética de *L. vannamei* atualmente representada nos plantéis de reprodutores existentes nos diferentes centros de cultivo aqui estudados.

Pesquisas que incluam o estudo de espécies nativas também devem fazer parte de um conjunto de ações que visem o desenvolvimento e a sustentabilidade da atividade no país. A compreensão do valor potencial de reprodutores nativos, para uso imediato ou em sistemas futuros, para aumento de produtividade vem sendo algo discutido pela Organização das Nações Unidas desde a década de 80 (FAO, 1981). Procedimentos para descrição e caracterização de diferentes populações cruzantes e para o desenvolvimento de bancos de dados podem ser estratégias interessantes para serem usadas em programas futuros de melhoramento animal (Barker, 1994). Apesar de no passado algum esforço ter sido empenhado no cultivo de camarões nativos à costa brasileira, as baixas taxas de produtividade e a falta de tecnologias de manejo desestimularam, na época, a domesticação dessas espécies (Wainberg e Câmara, 1998). Entretanto, novas tentativas devem ser feitas, uma vez que, atualmente, a indústria camaroneira no Brasil depende exclusivamente de uma espécie exótica para garantir a totalidade de sua produção.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- (1) O atual manejo realizado pelo setor de maturação dos laboratórios de produção de pós-larvas de camarões *Litopenaeus vannamei* existentes no Brasil, contribui de maneira efetiva para diminuição dos níveis de diversidade genética dos estoques de reprodutores desta espécie, devido, principalmente, ao reduzido número de indivíduos utilizados como reprodutores e à utilização de animais aparentados, e/ou em gerações já avançadas, como progenitores das próximas gerações.
- (2) O aumento no número de reprodutores e a utilização de animais geneticamente mais diferenciados para composição de novos estoques reprodutores poderão contribuir para uma maior diversificação da base genética da população fundadora, atenuando prováveis efeitos que possam vir a ocorrer nestes plantéis, decorrentes de deriva genética e/ou aumento na taxas de endocruzamentos.
- (3) As marcas moleculares de RAPD identificadas no presente trabalho, através da utilização dos oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias selecionados, se mostraram bastante eficientes, evidenciando um padrão de amplificação altamente reprodutível capaz de estimar os níveis de diversidade genética e estabelecer relações de identidade e distância genética para os diferentes plantéis estudados.

- (4) Os índices de similaridade e de diversidade genética obtidos para as amostras analisadas revelaram indivíduos geneticamente muito homogêneos. Plantéis em F0 e F1 apresentaram valores de variabilidade genética extremamente reduzidos para estoques em fase de domesticação ainda inicial, sugerindo que fenômenos relacionados à deriva genética e/ou efeito fundador devam ser os principais responsáveis pelos baixos níveis de variação genética observados em populações recém fundadas.

- (5) Os valores de distância e identidade genética estabelecidos para os 15 plantéis analisados demonstraram alta similaridade genética para estes plantéis, embora, através da análise do dendrograma estabelecido pôde-se identificar os plantéis geneticamente menos relacionados. Estes dados poderão ser úteis para auxiliar cruzamentos dirigidos que visem a abertura de novos estoques reprodutores.

- (6) Os resultados obtidos através das análises realizadas na linhagem de endocruzamento demonstraram que o manejo utilizado para manutenção deste plantel contribui, de fato, para a redução dos níveis de variabilidade genética das populações produzidas em cativeiro, podendo promover mudanças significativas nas frequências gênicas das gerações subseqüentes.

CONCLUSÕES

- (7) O manejo realizado pelos laboratórios de larvicultura para abertura e manutenção dos estoques reprodutores deve se basear não somente na seleção fenotípica individual dos animais (seleção massal). Mudanças significativas nas frequências gênicas das populações cativas podem conduzir ao desaparecimento de alelos raros. Entretanto, se obtidas de maneira eficiente podem contribuir para a melhoria e manutenção de características de performance consideradas vantajosas.
- (8) O dendrograma de similaridade genética determinado para as cinco gerações endocruzadas, através da análise dos resultados obtidos com base nos valores de distância e identidade genética, demonstrou que conforme a geração avança esta vai modificando sua estrutura genética e se distanciando cada vez mais da população original.
- (9) A análise de regressão não-linear, relacionando os valores de similaridade genética, obtidos para as cinco linhagens endocruzadas, com as suas respectivas gerações, demonstrou que conforme o número de gerações avança o nível de similaridade média observada entre os indivíduos também aumenta. Caso esta tendência seja mantida, os níveis de similaridade genética poderão assumir valores próximos a 100% , antes mesmo deste plantel atingir a 19ª geração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC (2002) O Agronegócio do Camarão Marinho Cultivado. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Recife, 20 pp.

ALBERTONI, E.F. (1999) Aspectos de crescimento, reprodução e alimentação de peneídeos e paleomonídeos em lagoas costeiras do Norte do estado do Rio de Janeiro. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1990) Molecular Biology of the Cell. 3ª ed., New York.

ALONSO, B.M.E.; JOO, L.; ESPINOSA, G. (1987) Análisis electroforético e caracterización bioquímica de las esterasas de músculo en *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. Rev Invest Mar 9 (1): 1-10.

ALTUKHOV, Y.P.; SALMENKOVA, E.A. (1987) Stock transfer relative to natural organization, management and conservation of fish populations. In: Ryman N and Utter F (eds) Population Genetics and Fishery Management. Seattle and London: Univ. Washington Press, pp 333-44.

ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E. (1998) El cultivo de camaron en Brasil. Panorama Acuícola 3: 10-10.

ARAI, K. (2001) Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture 197: 205-228.

ARANA, L.V. (1999) Aqüicultura e Desenvolvimento Sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira. Editora da UFSC, 1ª ed., Florianópolis, SC.

AURÉLIO, B.H.F. (1998) Novo Dicionário da Língua Portuguesa. Editora Nova Fronteira, 1ª ed., Rio de Janeiro, RJ.

AYRES, M., AYRES, JR. M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. (2000) BioEstat 2.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas e Médicas. CNPq, Brasília.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGSHAW, J.C.; BUCKOLT, M.A. (1995) Application of DNA probe technology in shrimp aquaculture. II Congresso Ecuatoriano de Acuicultura 1: 29-33.
- BALDWIN, J.D.; BASS, A.L.; BOWEN, B.W.; CLARK, W.H. (1998) Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol Phylogenet Evol* 10: 399-407.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. F. (1994) Application of RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117-123.
- BARKER, J.S.F. (1994) Animal breeding and conservation genetics. In: Loeschcke V, Tomiuk J, Jain and SK (eds), *Conservation Genetics*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp 382-395.
- BARMAN, H.K.; BARAT, A.; YADAV, B.M.; BANERJEE, S.; MEHER, P.K.; REDDY, P.V.G.K.; JANA R.K. (2003) Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture* 217:115-123.
- BARNES, R. D. (1984) *Zoologia dos Invertebrados*. Editora Roca, 1ª ed., São Paulo, SP.
- BÁRTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G.H.; KOVÁCS, B.; URBÁNYI, B.; TAMÁS, G.; HORVÁTH, L.; ORBÁN, L. (2003) Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture* 219: 157-167.
- BATTACHARYYA, R.; SINGH; HAZRA, T., K.; MAJUMDER, H. K. (1993) Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. *Microbiology Letters* 114: 99-104.
- BENTZEN, P., HARRIS, A. S.; WRIGHT, J. M. (1991) Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquacultural species of salmonids and Tilapia. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Basel: Birkhauser Verlag, pp 243-62.
- BENZIE, J.A.H. (2000) Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31: 95-119.
- BENZIE, J. A. H.; FRUSHER, S.; BALLMENT, E. (1992) Geographical variation in allozyme frequencies of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) populations in Australia. *Aust J Mar Freshwater Res.* 43: 715-725.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENZIE, J.A.P.; BALLMENT, E.; FRUSHER, S. (1993) Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. *Aquaculture* 111: 89-93.
- BENZIE, J.A.P.; KENWAY, M.; TROTT, L. (1997) Estimates for the heritability of size in juvenile *Penaeus monodon* prawns from half-sib matings. *Aquaculture* 152: 49-53.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY A.; BORGHETTI, J.R. (2003) Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, Curitiba, 128 pp.
- BOSTOCK, A.; KHATTAK M. N.; MATTHEWS, R.; BURNIE, J. (1993) Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* 139: 2179-2184.
- BOWMAN, J.C. (1981) Introdução ao Melhoramento Genético Animal. Editora Pedagógica e Universitária e EDUSP, São Paulo, 87 pp.
- BOWMAN, T.E.; ABELE, L.G. (1982) Classification of the Recent Crustacea. In: Abele LG (eds) *The Biology of Crustacea: systematics, the fossil record and biogeography*. Academic Press, Inc. New York, 319 pp.
- BOYD, C. (1992) Shrimp Pond Bottom Soil and Sediment Management. In: Wyban J (eds) *World Aquaculture' 92, special session on shrimp farming*. The World Aquaculture Society pp 166-181.
- BRANDINI, F.P.; SILVA, A.; PROENÇA, L.A.O. (2000) Oceanografia e Maricultura. In: Valenti WC, Poli CR, Pereira JA and Borghetti JR (eds) *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, DF.
- BRAY, W.A.; LAWRENCE, A.L.; LESTER, L.J.; SMITH, L.L. (1990) Hybridization of *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) and *Penaeus schmitti* Bukerroad, 1936 (Decapoda) *J Crustacean Biol* 10: 278-283.
- BURUKOVSKII, R.N. (1985) Key to Shrimps and Lobsters. In: Kothekar VS (ed) *Russian translation series Copyright*, A.A. Balkema, Rotterdam, 174 pp.
- CARVALHO, G.R., PITCHER, T.J. (1995) *Molecular Genetics in Fisheries*, 1ª ed., Editora Chapman & Hall, London, UK.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHOW, S.; SANDIFER, P.A. (1991) Differences in growth, morphometric traits and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. *Aquaculture* 92: 165-178.
- COLWELL, R.R. (1995) Recent developments in marine biotechnology. In: Calderón J and Sorgeloos P (eds) *Memórias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Ecuador, pp 1-14.
- COMINCINI, S.; SIRONI, M.; BANDI, C.; GIUNTA, C.; RUBINI, M.; FONTANA, F. (1996) RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. *Heredity* 76: 215-221.
- CRUZ, P.; MEJIA-RUIZ, C.H.; PEREZ-ENRIQUEZ, R.; IBARRA, A.M. (2002) Isolation and Characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology* 2: 239-241.
- CURRIE, D. (1994) Sustainable aquaculture in developing countries. *World Aquaculture* 25 (4): 20-25.
- D'AMATO, M.E.; CORACH, D. (1996) Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli* (Caridea: Palaemonidae) Evaluated by RAPD analysis. *J of Crustacean Biol* 16 (40): 650-655.
- DÍAZ, R.; MÁRQUEZ, M.E.; ESPINOSA, G.; BEROVIDES, V. (1995) Estudio morfométrico y electroforético de tres especies de camarones peneidos comerciales en cultivo. *Rev Invest Mar* 16: 1-3.
- D'INCAO, F. (1984) Estudo sobre o crescimento de *Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis* Perez-Farfante, 1967, da Lagoa dos Patos, RS. *Atlântica* 7: 73-84
- D'INCAO, F. (1991) Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos RS, Brasil. *Atlântica* 13 (1) 159-169.
- DONG, Z.; ZHOU, E. (1998) Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research* 29: 595-600.
- ENGLISH, L.J.; NELL, J.A.; MAGUIRE, G.B.; WARD, R.D. (2001) Allozyme variation in three generation of selection for whole weight in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 193: 213-225.
- ESPINOSA, G.; BEROVIDES, V.; DÍAZ, R. (1989) Genética bioquímica y morfometría del camarón blanco *P. schmitti* de Cuba. *Rev Invest Mar* 10 (2): 157-162.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FALCONER, D.S. (1981) Introdução a Genética Quantitativa. Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 279 pp.
- FAO (1981) Animal genetic resources conservation and management. Proceedings of the FAO/UNEP Technical Consultation. FAO Animal Production and Health Paper 24. FAO, Rome.
- FAO (1990) The definition of aquaculture and collection of statistics. Aquaculture Minutes 7, Roma.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (1996) Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 pp.
- FRANKLIN, I.R. (1981) Population size and the genetic improvement of animals. In: Barker JSF, Hammond K and McClintock AE (eds) Future developments in the genetic improvement of animals. Academic Press Australia, Sydney, pp181-196.
- FREITAS, P.D.; GALETTI Jr., P.M. (2002) PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Genetics and Molecular Biology 25 (4): 431-344.
- FRIES, R. (1993) Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. Anim Genet 24: 111-116.
- FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A. (1991) *Piscirickettsia salmonis*, a newly-described intracellular pathogen of salmonid fish. International Marine Biotechnology Conference, Baltimore, MD.
- FUCHS, H.; GROSS, R.; STEIN, H.; ROTTMANN, O. (1998) Application of molecular genetic markers for differentiation of bream (*Abramis brama* L.) populations from the rivers Main and Danube. J Appl Ichthyol 14:49-55.
- GALETTI Jr., P.M.; FREITAS, P.D. (1999) A genética de camarão no Brasil. Rev da ABCC 1(1): 30-32.
- GALVIN, P.; MCKINNELL, S.; TAGGART, J.B.; FERGUSON, A.; O'FARREL, M.; CROSS, T.F. (1995) Genetic stock identification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using single locus minisatellite DNA profiles. J of Fish Biol 47 (suppl.A.): 186-199.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GARCIA, D. J.; FAGGART, M. A.; RHOADES, L.; WYBAN, J. A.; CARR, W. H.; SWEENEY, J. N.; EBERT, K. M.; ALCIVAR-WARREN, A. (1994) Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetics **thechnics**. Mol Mar Biol Biotechnol 3: 270-280.
- GOODNIGHT, C.J. (1988) Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variance. Evolution 42: 441-454.
- GUERRELHAS, A.C.B. (1997) Seed production of *Penaeus vannamei* in Brazil. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura, Tegucigalpa, Honduras, pp 152-153.
- GUSMÃO, J. (2001) Sistemática molecular e genética populacional de espécies brasileiras de camarão (*Penaeus*: Decapoda: Penaeidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 120 pp.
- HARRIS, A.S.; BIERGER, S.; DOYLE, R.W.; WRIGTH, J.M. (1991) DNA fingerprintin of Tilapia. *Oreocoromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. Aquaculture 92: 157-163.
- HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P.M. (2003) RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. Genetics and Molecular Biology 26 (1): 19-25.
- HEATH, D.D.; IWAMA, K.; DELVIN, R.H. (1993) PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. Nucleic Acids Research 21: 5782-5785.
- HEDGECOCK, D.; SHLESER, R.A.; NELSON, K. (1976) Applications of biochemical genetics to aquaculture. J Fish Res Board Can 33: 1108-1119.
- HEW, C.L.; FLETCHER, G. (2001) The role of aquatic biotechnology in aquaculture. Aquaculture 147: 191-204.
- HILL, W.G.; KEIGHTLEY (1988) Interrelations of mutation, population size, artificial and natural selection. In: Weir BS, Eisen EJ, Goodman MM and Namkoong G (eds) Proc Second Internat Conf Quant Genet. Sinauer, Sunderland, MA, pp 57-70.
- HILLEL, J.; SCHAAP, T.; HABERFELD, A.; JEFFREYS, A.J.; PLOTZKY, Y.; CAHANER, A.; LAVI, U. (1990) DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. Genetics 124: 783-789.
- HOLTHIUS, L.B. (1980) Shrimps and prawns of the world; an annotated catalogue of species of interest to fisheries. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) Species Catalogue, Rome, 271pp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HTTP//: WWW.SHRIMP.UFSCAR.BR (2003) Website Projeto Genoma Camarão, CNPq, ABCC, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- JAMOS-PAREDES, J.; GRIJALVA-CHON, J. M. (2003) Allozyme genetic analysis in hatchery strains and wild blue shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* (Stimpson), from the Gulf of California. *Aquaculture Research* 34: 221-234.
- JACCARD, P. (1901) Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat* 37: 547-579.
- LABACENA, M.E.; TORRES, M.; ESPINOSA, G. (1994) Variabilidad y distancia genética en especies de *Penaeus*. *Rev Invest Mar* 15: 80-87.
- LAWRENCE, A.L.; BRAY, W.A.; WILKENFELD, J.S.; LESTER, L.J. (1984) Successful interespecific cross of two species of marine shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus setiferus*. *World Mariculture Soc*: 50ª (abstract).
- LEONG, J.; MUNN, C.B. (1991) Potential uses of recombinant DNA in the development of fish vaccines. *Bull Eur Assn Fish Path* 11: 30-40.
- LESTER, L.J.; PANTE, M.J.R.; (1992) Genetics of *Penaeus* species. In: Fast AW, Lester LJ (eds) *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier Science Publishers BV, pp 29-52.
- LIN, M.N.; TING, Y.Y.; HANYU, I. (1988) Hybridization of two close penaeid species *Penaeus monodon* x *P. penicillatus* and *P. penicillatus* x *Penaeus monodon*, by means of spermatophore transplantation. *Bull Taiwan Fish Res Inst* 45: 85-10.
- LÓPEZ, G.E.; JAGER, M.; GARCÍA-MACHADO, E.; PICHES, Y.B.; RODRÍGUEZ, N.C.; BARCIA, A.R.; DEUTSCH, J. (2001) *Biotecnología Aplicada* 18: 232-234.
- MANNING, D.S.; LEONG, J.C. (1990) Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 179:16-25.
- MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos: In: Matioli S R (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, 202 pp.
- MOAV, R.; BRODY, T.; WOLHFARTH, G.; HULATA, G. (1976) Applications of electroforetic genetic makers to fish breeding. I. advantages and methods. *Aquaculture* 9: 217-28

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MOORE, S.S.; WHAN, V.; DAVIS, G.P.; BYRNE, K.; HETZEL, D.J.S.; PRESTON, N. (1999) The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 173: 19-32.
- NAICIRI, Y.; VIGOUROUX, Y.; DALLAS, J.; DESMARAIS, E.; DELSERT, C.; BONHOMME, F. (1995) Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the european flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Mol Mar Biol Biotechnol* 4: 83-89.
- NARCHI, W. (1973) *Crustáceos*. Editora Polígono/EDUSP. São Paulo, 116 pp.
- NASCIMENTO, P.A.M.; CARDOSO, J.; KOPP, E.E.; TOMPSON, M.M.; LIMA, E.F.; FERREIRA, A.G. (1995) Cultivar camarões. A chance de mitigar os impactos ambientais da pesca. *Panorama da Aqüicultura* 05: 19-21.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between population. *Am Nat* 106: 283-292.
- NEI, M. (1973) The theory and estimation of genetic distance. In: Morton NE (ed) *Genetic structure of populations*. University of Hawaii, Honolulu, pp 45-54.
- NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, pp 176-187.
- NUNES, A.J.P. (2001) O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. *Panorama da Aqüicultura* 11 (65): 26-33.
- O'BRIEN, S.J.; ROELKE, M.E.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKLER, C.A.; MELTZER, D.; COLLY, L.; EVERMANN, J.F.; BUSH, M.; WILDT, D.E. (1985) Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227 (4693): 1428-1434.
- PAIVA, I.; ARRAIS, E. (1997) *Carcinicultura marinha brasileira: realidade e perspectiva*. Rev da ABCC 4: 6-10.
- PAIVA, M.P. (1997) *Recursos Pesqueiros Estuarinos e Marinhos do Brasil*. Editora da EUFC, Fortaleza.
- PAYNTER, K.T.; CHEN, T.T. (1991) Biological activity of biosynthetic rainbow trout growth hormone in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Biol Bull* 181: 459-462.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PEREZ, J.E.; ROMERO, O.Z. (1991) Genetic improvement in crustacean. *Estud Oceanol* 10: 131-137.
- PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. (1997) Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Éditions du Muséum Paris* 175: 1-79.
- PILLAY, T.V.R. (1996) The challenges of sustainable aquaculture. *World Aquaculture* 27 (2): 7-9.
- PINHEIRO, M.A.A.; HEBLING, N.J. (1998) Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In: Valenti WC (ed) *Carcinicultura de água doce: Tecnologia para produção de camarões*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília, 383 pp.
- PLATAFORMA TECNOLÓGICA DO CAMARÃO MARINHO CULTIVADO (2001) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastacimento, Departamento de Pesca e Aqüicultura: MAPA/SARC/DPA, CNPq, ABCC, Brasília, 276 pp.
- PRESTON, N.P.; CLIFFORD III, H.C. (2002) Melhoramento genético do camarão. *Rev da ABCC* 4(2): 30-33.
- RANA, K. (1997) Recent trends in a global aquaculture production: 1984-1995. *FAO Aquaculture Newsletter* 16:14 -19, Rome.
- RAYMOND, J.A.; RADDING, W.; De VRIES, A.L. (1989) Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by antifreezes. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 881.
- RICO, C.; KUHNLEIN, U.; FITZGERALD, G.J. (1991) Spawning patterns in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): an evaluation by DNA fingerprinting. *J of Fish Biol* 39 (Suppl. A): 151-158.
- ROBERTSON, A. (1952) The effect of inbreeding on the variation due to recessive genes. *Genetics* 37: 189-207.
- ROCHA, I.P. (2002) Uma análise sobre a produção, demanda e preços do camarão cultivado, com ênfase para o mercado norte americano. *Rev da ABCC* 4(2): 70-85.
- ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J. (2003) A carcinicultura brasileira em 2002. *Rev da ABCC* 5 (1): 30-45.
- ROCHA, I.P. (1997) Uma alternativa para o desenvolvimento da região nordeste. *Panorama da Aqüicultura* 07: 17-19.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ROHLF, F.L.J. (1993) NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80. Applied Biostatistics. Steauket, NY.
- ROSENBERRY, B. (1994) O cultivo passo a passo. Panorama da Aqüicultura 4: 14-18.
- ROSENTHAL, H. (1994) Aquaculture and environment. World Aquaculture 25(2): 4-11.
- SAGI, A.; COHEN, D. (1990) Growth maturation and progeny of Sex reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. World Aquaculture 21: 87-90.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed., Cold Spring Harbor, NY.
- SBORDONI, V.E.; De MATTHAEIS, E.; COBOLLI, S.M.; LA ROSA, G.; MATTOCCIA, M. (1986) Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). Aquaculture 57: 239-251.
- SHAKLEE, J.B. (1983) The utilization of isozymes as gene markers in fisheries management and conservation. Isozymes: Current topics in Biological and Medical Research 11: 213-47.
- SLETTAM, A.; OLSAKER, I.; LIE, O. (1993) Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitives sequences from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Animal Genet 24: 195-197.
- SNEATH, P.A.; SOKAL, R.R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, 573 pp.
- SNNUCKS, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. Elsevier Science 15 (5): 199-203.
- STAHL, G. (1983) Difference in the amount and distribution of genetic variation between natural populations and hatchery stocks of Atlantic salmon. Aquaculture 33: 23-32.
- SUNDEN, S.L.F.; DAVIS, S.K. (1991) Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. Aquaculture 97: 131-142.
- TASSANAKAJON, A.; SIRIPORN, P.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. (1997) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger (*Penaeus monodon*) in Thailand. Mol Mar Biol Biotechnol 6 (2): 110-115.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TASSANAKAJON, A.; TIPTAWONNUKUL, A.; SUPUNGUL, P.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7: 55-61.
- TELLES, M.P.C.; MONTEIRO, M.A.R.; RODRIGUES, F.M.; SOARES, T.T.N.; RESENDE, L.V.; AMARAL, A.G.; MARRA, P.R. (2001) Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira* 2 (2): 87-95.
- TEMPLETON, A.R.; READ, B. (1993) The elimination of inbreeding depression in a captive herd of Speke's gazelle. In: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, McBryde F and Thomas L (eds) *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA., pp 241-261.
- THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M.; WATTS P.C. (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184.
- TOLEDO-FILHO, S.A.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1996) Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética* 3: 59.
- TOMASSO, J.; BRUNE, D. (1991) Aquacultural water quality: the emergence of an applied discipline. In: David Brune: Tomasso Joseph (Eds), *Aquaculture and water quality*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, pp 11-20.
- UTTER, F. M. (1991) Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *J Fish Biol* 39(Suppl. A): 1-20.
- VALENTI, W.C. (2000) Aquaculture for sustainable development. In: Valenti WC, Poli CR, Pereira JA, Borghetti JR (eds) *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília.
- VALENTINI, H.; D'INCAO, F.; RODRIGUES, L.F.; REBELO NETO, J.E.; RAHN, E. (1991) Análise da pesca do camarão rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) nas regiões sudeste e sul do Brasil. *Atlântica* 13 (1): 143-157.
- VIEIRA, P. (1991) Rumo à revolução azul: contribuição à pesquisa de estratégias de desenvolvimento sustentável em ecossistemas litorâneos do Sul do Brasil. Programa de Pós-Graduação em Sociologia Política da UFSC, Florianópolis, SC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VILLAESCUSA, A.; CAMACHO, A.; RIVALTA, V. (1984) Polimorfismo de la fosfogluco isomerasa y de la fosfoglucomutasa en el camarón rosado (*Penaeus notialis*). *Ciencias Biologicas* 12: 23-29.
- VRIJENHOEK, R.C. (1989) Genotypic diversity and coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. In: Otte D and Endler J (eds) *Speciation and its consequences*. Sunderland MA, pp 368-400.
- WAINBERG, A.A.; CÂMARA, M.R. (1998) Brazilian shrimp farming... it's growing, but is it sustainable? *World Aquaculture* 27-30.
- WANG, J. (1990) Managing shrimp pond to reduce discharge problems. *Aquacultural Engineering* 9: 61-63.
- WASKO, A.P.; GALETTI Jr., P.M. (2002) RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implication for the conservation of the species. *Hydrobiologia* 474: 131-137.
- WEIR, B.; ALLARD, R.; KAHLER, A. (1972) Analysis of complex allozyme polymorphisms in a barley population. *Genetics* 71: 505-523.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218
- WILKS, A. (1995) Prawns profit and protein aquaculture and production. *The Ecologist* 25 (213): 120-125.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- WOLFUS, G.M.; GARCIA, D.K.; ALCIVAR-WARREN, A. (1997) Application of microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 36-47.
- WOOD, C.C.; RUTHEFORD, D.T.; MCKINNELL, S. (1989) Identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in mixed stock fisheries in British Columbia and Southeast Alaska using biological markers. *Can J Fish Aquat Sci* 46: 2108-20.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WRIGHT, J.M. (1993) DNA fingerprinting of fishes. In: Hochachka PW and Mommsen TP (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes , Elsevier, Amsterdam 2: 57-91.
- WUTHISUTHIMETHAVEE, S.; LUMUBOL, P.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S. (2003) Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Aquaculture 62413: 1-12.
- XIANG, J.H.; ZHOU, L.H.; LIU, R.Y.; ZHU, J.Z.; LI, F.H.; LI, X.H.; LIU, X.D. (1992) Induction of the tetraploids of the chinese shrimp, *Penaeus chinensis*. Proceedings of the Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Beijing, 20-24. China Science and technology Press, Beijing, pp 841-846.
- YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. (1999) Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, Popgene version 1.31.