



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

**RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE PLANTÉIS DE REPRODUTORES DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*, ATRAVÉS DO
SEQÜENCIAMENTO DOS GENES RNAr 16S E COI DO DNAm.**

ANA KARINA DE FRANCISCO

SÃO CARLOS - SP
2003

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

RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE PLANTÉIS DE REPRODUTORES DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*, ATRAVÉS DO
SEQÜENCIAMENTO DOS GENES RNAr 16S E COI DO DNAm.

ANA KARINA DE FRANCISCO

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

SÃO CARLOS - SP
2003

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

F818rg

Francisco, Ana Karina de.

Relações genéticas entre plantéis de reprodutores do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, através do seqüenciamento dos genes RNAr 16S e COI do DNAm / Ana Karina de Francisco. -- São Carlos : UFSCar, 2003. 59 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Genética. 2. Camarão. 3. Distância genética. 4. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)



**RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE PLANTÉIS DE REPRODUTORES DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*, ATRAVÉS DO
SEQÜENCIAMENTO DOS GENES RNAr 16S E COI DO DNAm.**

Ana Karina de Francisco

Orientador

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Dedico esta dissertação às
pessoas que me apoiaram
em todos os momentos da
minha vida e que
compartilharam e
compartilham comigo todos
as emoções, boas ou ruins:
pai, mãe, vó Zaia e vô Nim.

“Hoje me sinto mais forte,
mais feliz, quem sabe,
só tenho a certeza
de que muito pouco sei,
ou nada sei.....”

É preciso amor para poder
pulsar
É preciso paz para poder
sorrir
É preciso a chuva para
florir.....”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

- Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
- A EMPARN (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte).
- A empresa Aquatec, sua proprietária (Ana Carolina Guerrelhas) e seus funcionários.
- Ao Prof. Dr. Luiz A. C. Bertollo, da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Ao Prof. Dr. Orlando M. Filho, da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Aos colegas Alexandre, Andréia e Joelma, pelo auxílio na produção dos géis de seqüenciamento, e ao César, pela auxílio nos problemas técnicos
- A Iara, pelo auxílio com as análises dos dados.
- Às meninas da secretaria do PPGGEV, Rose, Regiane e Tatiane, pela resolução de todos os problemas burocráticos.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, pela oportunidade de realizar um dos meus grandes sonhos (esta tese), do conhecimento e aprendizado importantes para a minha vida profissional, e pela confiança, apoio e incentivo.
- A Lelê, Débora, Paulo, Carol, Liano, Welington, Karine, Rubens, Priscila e Alexandre, pelo auxílio, companheirismo e compreensão.
- A Eli, Elô, Danielle e Marcelo, pelo apoio, auxílio, carinho e compreensão.

- Ao grande amigo Vitor, por ouvir minhas lamentações e também pelo grande apoio que sempre me deu no laboratório e na confecção dessa tese.
- Ao Marc que chegou há pouco tempo, mas me ajudou muito principalmente nesses momentos finais de ansiedade.
- A Celinha, sempre prestativa, pelos conselhos e auxílio técnico, além do carinho e solidariedade.
- A Terumi, minha "salvadora", pessoa imprescindível na execução desse trabalho, pelo carinho e apoio nos momentos mais complicados, e sem a qual essa tese não teria caminhado.
- A Paty, nossa "coorientadora", responsável pela minha paixão pelos camarões e que me deu todo o suporte técnico e teórico, contribuindo essencialmente para minha formação. "Não sei o que seria de mim sem você!!!"
- Aos amigos Marcos e Monique, pelo apoio e incentivo.
- A Thaís e Talita, grandes amigas, por estarem sempre do meu lado.
- As amigas Carol, Regininha, Ciça, Va, Ju, Taís, Taty (Brotas) e Tatão, pelo carinho e apoio.
- Ao pessoal de Natal, principalmente as amigas Delane, Temis e Débora pela calorosa recepção e carinho.
- A minha maravilhosa e muito querida família: Bruno, Vitor, Zé, Mariana, Murilo, Miriam, Molina, Thelma, Cris, Adriana e Adriana e principalmente aos meus irmãos, Cla, Déia, Ce e Ju, e aos meus tios Aristeu e Adriana, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.
- Aos meus avós Zaia e Nim, um dos melhores presentes que a vida me deu.
- Aa pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, por todo esforço, dedicação, apoio, incentivo, carinho, enfim, pela oportunidade de estar realizando este sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	II
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 - INTRODUÇÃO	
1.1 - Carcinicultura: desenvolvimento e histórico	02
1.2 - Marcadores Moleculares com ênfase ao DNA mitocondrial	06
2 – OBJETIVOS	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 - Coleta do Material.....	21
3.2 - Extração de DNA de tecidos sólidos.....	22
3.3 - Amplificação do gene 16S RNAr.....	23
3.4 - Amplificação do gene COI	24
3.5 – Purificação dos produtos de PCR.....	25
3.6 – Clonagem e sequenciamento dos fragmentos.....	25
3.7 – Análise dos dados.....	28
4 - RESULTADOS	
4.1 – Análises das seqüências do gene 16S RNAr.....	31
2.1. Análises das seqüências do gene COI.....	34
5- DISCUSSÃO	40
6 – CONCLUSÕES	45
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Plantéis de reprodutores de *L. vannamei* utilizado, com suas respectivas origens e gerações de cultivo.

Tabela 2: Valores de distância genética obtidos a partir da análise de seqüências do gene COI. Acima da diagonal encontram-se os valores de desvio padrão.

Figura 1: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, e da espécie *F. subtilis*, referentes ao gene RNAr 16S.

Figura 2: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, e das quatro seqüências obtidas do GenBank (AY264914, AF192087, AF192088 e AF192089), referentes ao gene RNAr 16S.

Figura 3: Dendrograma baseado no algoritmo “Neighbor-Joining” e no método de distância p obtido a partir de seqüências do gene RNAr 16S, relacionados aos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, além da espécie *F. subtilis* (os números acima dos braços representam os valores de “bootstrap”).

Figura 4: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, e da espécie *F. subtilis*, referentes ao gene COI.

Figura 5: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, e da seqüência obtida do GenBank (AY264901), referentes ao gene COI.

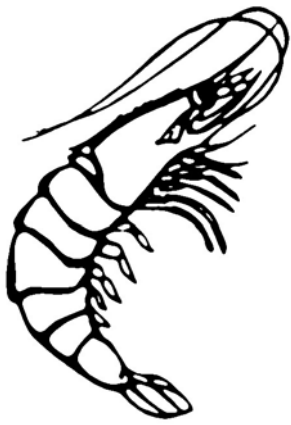
Figura 6: Dendrograma baseado no algoritmo “Neighbor-Joining” e no método de distância p obtido a partir de seqüências do gene COI (os números acima dos braços representam os valores de “bootstrap”), relacionados aos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, além da espécie *F. subtilis*.

RESUMO

O estudo das relações genéticas entre estoques constitui-se em uma ferramenta de grande utilidade em programas de cultivo. No presente trabalho foram estabelecidas as relações entre cinco plantéis de reprodutores do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, com base no seqüenciamento das regiões RNAr 16S e COI do DNAm. A espécie *Farfantepenaeus subtilis* foi utilizada como grupo externo. Não foram encontradas divergências genéticas entre as seqüências do gene 16S RNAr, possivelmente, devido ao fato de se tratar de uma região conservada. Já no dendrograma obtido a partir do seqüenciamento do gene COI pôde-se observar a formação de dois agrupamentos, um deles envolvendo os plantéis Aqua-044 e Aqua-045, e o outro, os plantéis Aqua-046 e Aqua-051. A formação desses agrupamentos pode estar relacionada à origem dos plantéis, bem como aos efeitos de deriva genética sofridos pelas populações fundadoras. Os resultados obtidos no presente trabalho podem constituir-se numa ferramenta de grande utilidade para o delineamento de programas de manejo mais adequados para os plantéis estudados.

ABSTRACT

The evaluation of genetic relationships among broodstocks is a useful tool for culture management programs. In the present work, the relationships amongst four broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* were established based on sequencing of 16S rRNA and COI regions from mtDNA. *Farfantepenaeus subtilis* was used as outgroup in mtDNA analysis. No divergence was found when sequences of the 16S rRNA gene were compared, likely due to the conservativeness of such region. Otherwise, at the dendrogram obtained from COI gene sequencing, clustering between Aqua-044 and Aqua-045 broodstocks and between Aqua-046 and Aqua-051 broodstocks was observed. The formation of these groupings may be related to the origin of the broodstocks as well as to the effects of genetic drift suffered by the founder populations. The results obtained in the present work may constitute a very useful tool for the delineation of more appropriate management programs for the analyzed broodstocks.



INTRODUÇÃO

1.1 Carcinicultura: desenvolvimento e histórico

Recentemente, a carcinicultura, ou cultivo de camarão, vem alcançando grande importância na pauta da produção brasileira. A atividade encontra-se na liderança das exportações do setor pesqueiro nacional, contribuindo para a ampliação dos superávits da balança comercial (Rocha, 2003). Além de ocupar uma posição de destaque no campo da economia, a carcinicultura ainda contribui para a melhoria das condições sociais do país, uma vez que são gerados empregos diretos e indiretos, abrangendo desde o nível de educação elementar até o superior (Sampaio e Costa, 2003).

O cultivo de camarão surgiu no sudoeste da Ásia, onde os pescadores artesanais utilizavam viveiros operacionalizados, através do movimento natural das marés, para criar larvas provenientes do mar (Arana, 1999). Em 1930, Motosaku Fujinaga iniciou seus experimentos com a desova em laboratório do camarão "kuruma" (*Marsupenaeus japonicus*). Na década de 50, os Estados Unidos iniciaram estudos de técnicas de produção de fitoplâncton marinho num laboratório em Galveston, no Texas. Este trabalho foi o primeiro passo para a produção e criação de larvas de camarão. No período de 1965 a 1975, com o declínio da pesca extrativista, a China, França e Taiwan começaram a investigar o cultivo de camarão sob o ponto de vista comercial. Entre 1975 e 1985 foram realizados inúmeros melhoramentos na técnica do cultivo de camarão, os quais culminaram no nascimento da nova indústria da carcinicultura, que vivenciamos hoje (Arana, 1999).

O cultivo de camarão marinho em ambientes controlados está baseado no ciclo de vida natural do animal. O processo de produção compreende as etapas de larvicultura, a qual consiste na obtenção de pós-larvas em laboratórios, e engorda, desenvolvida em fazendas que cultivam o camarão desde a fase larval até a idade adulta. A larvicultura está subdividida em dois setores: maturação e larvicultura propriamente dita. Alguns poucos laboratórios do país ainda possuem o setor de melhoramento. Os animais selecionados nas fazendas de cultivo (em relação ao tamanho, ausência de doenças e deformidades) são transportados para o setor de melhoramento, onde permanecem por aproximadamente 90 dias, se aclimatando às novas condições ambientais. Da totalidade de animais (aproximadamente 50.000) que iniciam o povoamento em um viveiro de engorda, apenas 6.000 são levados para o setor de melhoramento. Estes indivíduos passam por uma nova etapa de seleção, restando somente 1.200 animais, os quais são aclimatados ao fotoperíodo invertido, necessário para a maturação. O setor da maturação compreende o estágio reprodutivo, onde machos e fêmeas são colocados juntos em tanques e as fêmeas são submetidas ao processo conhecido como ablação, que consiste na retirada do pedúnculo ocular, o qual contém glândulas relacionadas à maturação das gônadas. Fêmeas ablatadas atingem a maturação sexual em cinco dias, ocorrendo, posteriormente, a cópula e a desova. Apesar de terem sido utilizados 1.200 animais neste setor, apenas 300 deles, aproximadamente, contribuirão para a reprodução. Vinte e quatro horas após a desova eclodem os náuplios (primeira fase do desenvolvimento larval), os quais são transportados para a larvicultura, onde passarão as fases de zoea,

misis e pós-larva em aproximadamente vinte dias. Passado esse período, as pós-larvas são encaminhadas para as fazendas de engorda, onde ficarão durante três a quatro meses até a despesca (Arana, 1999).

No Brasil, a carcinicultura iniciou-se nos anos 70, na região nordeste do país, com o cultivo da espécie nativa *Farfantepenaeus brasiliensis*, e da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*. No entanto, na década de 80 passou-se a cultivar também o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). A introdução dessa espécie exótica permitiu e vem permitindo um maior avanço da indústria camaroneira no país (Wainberg e Camara, 1998). No ano de 2002 a ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão) contabilizou a existência de 680 fazendas de engorda e 35 laboratórios de larvicultura, totalizando uma área de 11.016 hectares e alcançando a produção de 60.128 toneladas. Neste mesmo ano, as exportações brasileiras de camarão cultivado atingiram 37.800 toneladas, resultando na arrecadação de US\$ 155,0 milhões para o país. A produção elevada colocou o Brasil no primeiro lugar em produtividade do mundo (5,5 ton/ha/ano) e como o maior produtor de camarão cultivado do Hemisfério Ocidental, à frente do Equador e México, que tradicionalmente ocupavam as primeiras posições. No país, o nordeste é responsável por 96,5% de toda a produção nacional, sendo o Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco os principais produtores (Rocha e Rodrigues, 2003).

Apesar de encontrar-se em plena fase de desenvolvimento, algumas práticas relacionadas ao manejo dos estoques reprodutores tendem a prejudicar a manutenção das populações cativas, principalmente devido à

redução nos níveis de variabilidade genética, decorrente dos efeitos de deriva e endocruzamentos (Freitas e Galetti, 2002). Os organismos aquáticos possuem uma alta fecundidade, e por isso, geralmente, poucos reprodutores são utilizados para originar as gerações de cultivo, o que pode promover um forte efeito de deriva e endocruzamento, determinando uma diminuição na variação genética da progênie (Perez e Romero, 1991). Ocasionalmente, a perda de variabilidade genética pode vir acompanhada da diminuição de resistência a doenças, aumento de deformidades e diminuição do tamanho médio dos indivíduos (Garcia et al., 1996; Sbordoni et al., 1986).

O conhecimento da heterogeneidade dentro e entre estoques possibilita minimizar os efeitos deletérios do endocruzamento através do planejamento apropriado dos cruzamentos (Allegrucci et al., 1998). Dessa forma, a análise de relações genéticas entre plantéis de reprodutores pode se constituir numa ferramenta bastante útil para o manejo dos mesmos (Sekino et al., 2002). Principalmente no Brasil este tipo de estudo tem grande importância, já que o país adotou o cultivo de uma espécie exótica, determinando a necessidade de importação de animais para a formação dos primeiros plantéis de reprodutores nas fazendas brasileiras. Ainda, em 1997, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) estabeleceu normas para a reintrodução de organismos aquáticos para fins de aquicultura devido ao risco dessas espécies serem vetores de patógenos exógenos. No setor de carcinicultura, optou-se, desde então, pela extinção das importações de matrizes. Assim, passaram a ser utilizados animais provenientes de diferentes centros reprodutores de camarão do Brasil para a formação de

novos plantéis. Dessa forma, indivíduos de diversas procedências foram utilizados na constituição dos plantéis das fazendas brasileiras, podendo refletir em alguma diferenciação genética entre eles. Os marcadores moleculares constituem-se numa ferramenta de grande utilidade para o estabelecimento de relações genéticas entre populações ou plantéis de cultivo (Prioli et al., 2002; Apte et al., 2003) e poderão dar importantes contribuições ao manejo adequado dos plantéis de reprodutores.

1.2 Marcadores moleculares com ênfase ao DNA mitocondrial

Nos últimos tempos, a genética tem sido bastante utilizada para estudos relacionados a carcinicultura e aqüicultura em geral. O desenvolvimento de algumas tecnologias como marcadores moleculares e manipulação genética tem possibilitado grandes avanços nesta área.

Dentre as técnicas de manipulação genética, a transgênese e a indução de poliploidias vêm sendo as principais tecnologias empregadas em estudos de melhoramento genético dos camarões peneídeos. Preston et al. (2003) utilizaram várias técnicas de manipulação genética como a indução de poliploidia, a tecnologia de transgênicos e a irradiação para a produção de fêmeas estéreis de camarão, além de técnicas de transformação gênica, como a inativação de expressão, para melhorar características importantes sob o ponto de vista produtivo. Em outro estudo, Calderon e Sun (2003) analisaram alguns métodos para a introdução de seqüências de genes estranhos em células embrionárias de *L. vannamei*. Além dessas metodologias, alguns

pesquisadores vêm utilizando a hibridação interespecífica para a produção de animais com algumas características melhoradas. Benzie et al. (2001) produziram híbridos interespecíficos através da inseminação artificial de fêmeas de *Penaeus monodon* e machos de *P. esculentus*. Estes híbridos apresentaram uma razão de crescimento mais rápida, como em *P. monodon*, e alguns padrões de coloração de *P. esculentus*.

Por outro lado, a aplicação de marcadores genéticos tem possibilitado o diagnóstico de doenças e a determinação dos níveis de diversidade genética em diferentes grupos de organismos cultivados (Argue e Alcivar-Warren, 1999), além de ter uma grande aplicabilidade para o desenvolvimento de novas linhagens de camarão, no que diz respeito à utilização de alimento, crescimento e resistência à doença (Biotechnology, 2002).

Existem diversas classes de marcadores que podem estar baseadas em nível cromossômico ou molecular. No caso dos estudos moleculares, o DNA pode ser analisado através dos produtos de expressão de seus genes, como as isoenzimas, ou através de segmentos específicos de DNA (correspondentes a regiões expressas ou não do genoma) (Ferreira e Grattappaglia, 1996).

Os estudos cromossômicos em camarões vêm sendo pouco realizados, principalmente em virtude de dificuldades encontradas nas análises citogenéticas, devido ao elevado número e tamanho reduzido dos cromossomos. Alguns trabalhos relatam apenas o número cromossômico para algumas espécies de peneídeos (Chow, 1990; Campos-Ramos, 1997).

As análises enzimáticas, apesar do baixo grau de polimorfismo, foram de fundamental importância para os estudos de variabilidade genética em

camarão. Sunden e Davis (1991) compararam populações naturais de *L. vannamei* do México com populações de cultivo, através de análise de variação de aloenzimas, e observaram um baixo nível de diferenciação entre elas. Lester (1979) estudou a variabilidade genética de espécies de camarões peneídeos do Golfo do México e, apesar de detectar diferenciação inter- e intra-específicas, observou que o nível de variação de aloenzima não foi alto. Da mesma maneira, Labacena et al. (1994) realizaram estudos eletroforéticos das espécies *L. schmitti*, *L. vannamei* e *L. stylirostris* de tanques de cultivo, e detectaram baixo polimorfismo nos locos genéticos dos sistemas enzimáticos estudados.

Por outro lado, os estudos moleculares baseados em DNA vêm se mostrando muito mais eficientes, principalmente com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Ferreira e Grattappaglia, 1996; Karl e Avise, 1992). A tecnologia de PCR facilitou a descrição de várias classes de marcadores moleculares, os quais apresentam numerosas aplicações para o estudo de programas de criação de camarão, incluindo identificação de populações e análise de variabilidade genética (Sunden e Davis, 1991; Garcia et al., 1996; Freitas et al., 2001). Dentre os principais marcadores moleculares baseados em DNA encontram-se o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), ESTs (“Expressed Sequence Tags”), VNTRs (“Variable Number Tandem Repeats”) que constituem os mini e microsatélites e os polimorfismos do DNA mitocondrial (DNAm_t). Garcia et al. (1994), em um estudo sobre diversidade genética do camarão cultivado *L.*

vannamei, utilizando três técnicas moleculares (aloezimas, RAPD e RFLP), observaram que uma maior variação genética foi detectada utilizando RFLP do DNA mitocondrial e RAPD.

Freitas e Galetti (2002) estudaram a variação genética em duas linhagens de *L. vannamei* em diferentes estágios de cultivo (F_3 e F_{17}), utilizando “primers” de seqüências cernes de VNTR. Os autores detectaram uma menor variabilidade genética na linhagem em F_{17} quando comparada à linhagem em F_3 . Este resultado foi atribuído, principalmente, ao endocruzamento que ocorreu durante as gerações e à deriva genética produzida através do acasalamento entre um número reduzido de indivíduos.

Muito poucos microssatélites são conhecidos em camarões. Recentemente, Galetti e Jesus (2003) identificaram e caracterizam dois microssatélites em *L. vannamei*. Esses microssatélites mostraram-se polimórficos, sendo, portanto, de grande utilidade para estudos genéticos na carcinicultura. Xu et al. (1999), a partir de bibliotecas genômicas, identificaram 10 microssatélites polimórficos em *P. monodon*. Ainda nesta espécie, análises de microssatélite permitiram inferir sobre a estrutura genética de populações selvagens do Sul da Tailândia (Tassanakajon et al., 1998).

Os marcadores AFLP são utilizados, principalmente, para a construção de mapas de ligação. Moore et al. (1999) utilizaram marcadores microssatélite e AFLP para a construção de mapas de ligação, estabelecimento de pedigrees e identificação de QTLs ("Quantitative Trait Loci") em *M. japonicus*. Em um outro estudo, a técnica AFLP também foi utilizada para a construção de mapas de ligação em *P. monodon* (Wilson et al., 2002). Além dos marcadores AFLPs,

os ESTs também podem ser utilizados para a construção de mapas genéticos (Dhar et al., 2000) e para a determinação de variabilidade genética. Tong et al. (2002) desenharam 34 pares de “primers” a partir de ESTs de *P. monodon*. Estes “primers” mostraram-se polimórficos também no genoma de *Fenneropenaeus chinensis*, *M. japonicus* e *L. vannamei*.

Outra metodologia da biologia molecular que vem sendo utilizada em estudos genéticos na carcinicultura é a técnica de RAPD. Esta metodologia foi utilizada com eficiência para inferir sobre os níveis de variação genética em populações de *P. monodon* (Garcia e Benzie, 1995; Tassanakajon et al., 1997) e *L. vannamei* (Garcia et al., 1994). Similarmente, D'Amato e Corach (1996) analisaram a diversidade genética de duas populações do camarão *Macrobrachium borellii* e sua distribuição geográfica através da técnica de RAPD. As divergências genéticas entre seis populações de *L. stylirostris* do Golfo da Califórnia também foram determinadas utilizando-se esta metodologia (Aubert e Lightner, 2000). Freitas et al. (2001) analisaram a variabilidade genética de 16 plantéis de reprodutores de *L. vannamei* de diferentes fazendas de cultivo do Brasil utilizando marcadores RAPD. Os autores encontraram uma baixa variação genética na maioria dos plantéis analisados.

Dentre os diferentes tipos de marcadores moleculares, o DNA mitocondrial tem recebido especial interesse em estudos de relações genéticas tanto em populações naturais (Prioli et al., 2002; Chu et al., 1999; Daniels et al., 2002) quanto cultivadas (Allegrucci et al., 1998; Sekino et al., 2002; Iguchi et al., 1999).

As mitocôndrias ocupam um papel central no metabolismo. É nesta organela que acontece a fosforilação oxidativa, essencial para a produção de ATP, assim como uma variedade de outras funções bioquímicas. Dentro desta organela há um genoma, separado do nuclear, denominado DNA mitocondrial (DNAMt). Admite-se que as mitocôndrias, bem como os cloroplastos nas plantas, são originadas de procariotos que estabeleceram uma relação simbiótica com células eucarióticas primitivas, daí a existência de um genoma próprio (Boore, 1999). Entretanto, as funções celulares e mitocondriais são interdependentes, já que o DNA nuclear codifica subunidades protéicas para o processo de fosforilação oxidativa e várias macromoléculas necessárias para a manutenção estrutural e funcional das mitocôndrias (Johns, 1995).

O DNAMt é um genoma extracromossômico, altamente condensado, circular e de tamanho variável. O comprimento do DNAMt dos metazoários pode se estender de 13 a 42 Kb. A variação no comprimento é freqüente em invertebrados e vertebrados poiquilotermos, e parece evoluir rapidamente e distribuir-se tanto dentro (heteroplasmia) quanto entre indivíduos (Saccone et al., 1999). Um aspecto interessante diretamente relacionado à ocorrência de síndromes em humanos é a coexistência de DNA mitocondrial mutante e normal dentro de uma mesma célula. Em populações naturais de diversos organismos esse fenômeno foi considerado transitório e esporádico (Moysés, 1999).

Nos metazoários, o DNAMt constitui-se de uma molécula de DNA dupla fita, sem íntrons e com poucas regiões intergênicas. De seus 37 genes, 22 são de RNAs transportadores (RNAt), dois são de RNAs ribossômicos

(RNAr 12S e 16S), e 13 codificam polipeptídeos, sendo três da citocromo oxidase COI-III, 7 da NADH desidrogenase (ND1-6 e ND4L), dois de síntese de ATP (ATPase 6 e 8), e o do complexo do citocromo b (Cyt b). Esses polipeptídios são subunidades do complexo respiratório presente na membrana mitocondrial (Garesse et al., 1997). Uma região não codificante altamente variável dentro do DNAm é a região conhecida como D-loop, nos vertebrados ("Displacement Loop") (Wolstenholme, 1992), a qual possui os sítios de iniciação da transcrição e replicação do DNA mitocondrial (Meyer, 1994).

Em alguns DNAm todos os genes são transcritos por apenas uma das fitas, em outros os genes estão distribuídos entre as duas fitas. Em alguns casos cada fita é transcrita como um único e grande policístron, o qual é processado após a transcrição em mensagens gênicas específicas. Esse processamento pode ser realizado por RNAs cuja estrutura secundária possui um sinal de clivagem (Boore, 1999).

Os processos de transcrição e replicação do DNAm são melhor estudados em mamíferos (Clayton, 1984; 1991; 1992). Esses processos são relativamente simples em relação às seqüências regulatórias e ao maquinário enzimático envolvido. Os elementos de controle estão na região não codificadora. Em muitos animais, a maquinaria de transcrição consiste de uma RNA polimerase mitocondrial e um fator de especificidade, tornando este sistema altamente específico nas diversas espécies. Já a replicação do DNAm é realizada por uma γ -polimerase (Garesse et al., 1997).

Segundo Garcia-Machado et al. (1996), a taxa de substituição de nucleotídeos do DNAm é 10 vezes maior do que dos genomas nucleares.

Essa alta razão de evolução pode ser devido à falta de histona e mecanismos de reparo (Garesse et al., 1997), bem como a uma maior incidência de transições (substituição de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra) do que transversões (mudança de uma purina por uma pirimidina e vice-versa) acontecendo em todas as posições dos códons dos genes mitocondriais (Meyer, 1994).

A utilidade do DNAm como marcador molecular foi descoberta na década de 70 (Awise et al., 1979 a, b; Brown et al., 1979). Desde então, ele tem sido muito utilizado para estudos moleculares de genética de populações e evolução (Moysés, 1999). Algumas características são únicas do sistema mitocondrial: 1) ele mostra uma organização altamente compacta com alguns genes apresentando “overlaps”; 2) possui herança materna e não-Mendeliana; 3) usa um código genético diferente do universal; 4) os 22 RNAs do genoma mitocondrial são suficientes para codificar completamente os RNAs mitocondriais (Garesse et al., 1997). Essas características tornam o DNAm um bom instrumento para análise molecular (Wilson et al., 1987), sendo usado para estimar o grau de variabilidade (Awise, 2000), caracterizar estruturalmente as populações, inferir sobre a ocorrência de fluxo gênico (Fumagalli et al., 1999), relacionar a distribuição com a biogeografia histórica e apontar relações filogenéticas entre espécies próximas (Verspoor et al., 1999; Baldwin et al., 1998).

A molécula de DNA mitocondrial de camarão possui um tamanho estimado de 16.000 pares de bases (Bouchon et al., 1994; Wilson et al., 2000). Contudo, existem poucas informações a respeito desse DNA. Em camarões,

foram realizados o seqüenciamento parcial do genoma mitocondrial de *F. notialis* (Garcia-Machado et al., 1996) e o seqüenciamento completo do DNA mitocondrial de *P. monodon* (Wilson et al., 2000). Outros estudos em peneídeos, baseados em DNAMt, analisaram tanto a extensão total da molécula, através de RFLP, quanto alguns genes como 12S, 16S e COI, além da região D-loop (Klinbunga et al., 1999; Grabowski e Stuck, 1998; Bouchon et al., 1994).

A técnica de RFLP do DNAMt tem sido utilizada para análises de variabilidade genética e de estrutura de populações em camarões peneídeos. Duas populações de *P. monodon* da Austrália apresentaram-se geneticamente diferentes a partir de análises enzimáticas e de RFLP do DNAMt (Benzie et al., 1993). Os autores ainda observaram que o nível de variação do DNAMt foi relativamente maior que o enzimático. Klinbunga et al. (1999), através da análise de RFLP do DNA mitocondrial, também determinaram a variação genética e estrutura populacional de *P. monodon* da Tailândia.

Em camarões, os estudos envolvendo a região D-loop do DNAMt ainda são escassos. Apesar dessa região ter sido seqüenciada nas espécies *F. notialis* e *F. duorarum* (Garcia-Machado et al., 1996; Grabowski e Stuck, 1998), ela apresenta algumas dificuldades de amplificação não só em camarões, como em algumas espécies de peixes e aves (Galetti, comunicação pessoal). Essa dificuldade pode ser devida ao fato de se tratar de uma região altamente variável. A região D-loop é responsável pelo controle da replicação e transcrição do DNAMt e não codifica nenhum RNA. Por não possuir nenhum gene codificador, ela torna-se mais suscetível às mutações, determinando a

ocorrência de uma maior quantidade variação. A taxa de substituição nucleotídica dessa região chega a ser duas a cinco vezes maior do que a dos genes que codificam proteínas (Meyer, 1994).

Por outro lado, os RNAr mitocondriais são compostos por duas subunidades: a menor, denominada RNAr 12S e a maior, RNAr 16S, as quais encontram-se na porção altamente conservada do DNAm. No entanto, o gene RNAr 16S contém maior variação no comprimento do que o RNAr 12S. Mutações no comprimento são mais freqüentes em RNAr do que em genes que codificam proteínas, tornando a análise dessas regiões uma ótima ferramenta para o estabelecimento de relações filogenéticas (Meyer, 1994). Bouchon et al. (1994) observaram uma divergência genética de 1,68% entre duas linhagens de *P. monodon*, através de análises de RFLP do DNAm total e de fragmentos dos genes RNAr 12S e 16S. Os autores também analisaram as relações genéticas entre populações de cultivo de *M. japonicus*, além de determinar a localização do gene ribossomal 12S. Em um outro estudo, foi observada uma divergência nucleotídica de 11% através de análises de uma porção do gene RNAr 16S das espécies *F. notialis* e *L. schmitti* (Machado et al., 1993). Maggioni et al. (2001), analisaram as relações filogenéticas entre 10 espécies de peneídeos através do seqüenciamento parcial da região RNAr 16S. Segundo os autores, os dados obtidos mostram que essas espécies formam dois clados monofiléticos, corroborando a revisão sistemática de Perez-Farfante e Kensley (1997), a qual propõe a existência de dois gêneros na subordem Dendrobranquiata. A diversidade genética dentro e entre cinco populações de *P. monodon* do Golfo da Tailândia também foi determinada

através de análises de marcadores RAPD e de RFLP do gene RNAr 16S e de uma região intergênica COI-COII do DNAm (Klinbunga et al., 2001).

O gene da citocromo oxidase subunidade I (COI) codifica uma proteína responsável pela catálise terminal na cadeia respiratória mitocondrial, a qual está envolvida com o transporte de elétrons e com a translocação de prótons através da membrana (Saraste, 1990; Gennis, 1992). O gene COI é um marcador mitocondrial freqüentemente utilizado para estudos evolutivos por (1) ser a maior das três subunidades mitocondriais codificadoras da proteína citocromo oxidase (Clary e Wolstenholme, 1985; Beard et al., 1993) e por (2) sua seqüência protéica conter domínios funcionais altamente conservados e também regiões variáveis (Saraste, 1990; Gennis, 1992). Gusmão et al. (2000) utilizaram dados da subunidade citocromo oxidase I do DNA mitocondrial para comparar espécies de peneídeos do Atlântico e estabelecer possíveis relações filogenéticas. Relações evolutivas entre 13 espécies do gênero *Penaeus* também foram analisadas através do seqüenciamento de 558 pb do gene COI (Baldwin et al., 1998). Esses dados discordaram das análises morfológicas de Perez-Farfante e Kensley (1997) e do seqüenciamento da região RNAr 16S do DNAm (Maggioni et al., 2001), mas concordaram com as relações biogeográficas. Em um outro estudo, Palumbi e Benzie (1991) descobriram um alto nível de divergência molecular entre quatro espécies de camarões através do seqüenciamento parcial dos genes RNAr 12S e COI do DNAm.

Embora análises do DNAm tenham sido mais amplamente empregadas em estudos genéticos de populações naturais, esta metodologia

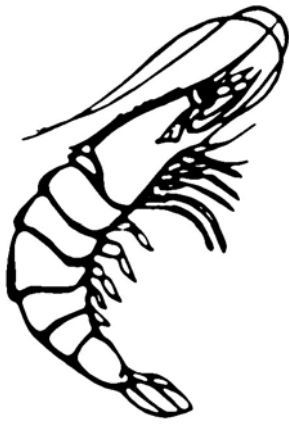
também tem apresentado resultados interessantes quando utilizada em estudos de populações cativas (Garcia et al., 1994; Bouchon et al., 1994).



OBJETIVOS

Diante da utilidade do conhecimento das características genéticas dos plantéis para o auxílio no manejo de programas de cultivo, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Analisar as relações genéticas entre cinco plantéis de reprodutores do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, pertencentes a um importante centro de produção de pós-larva do país, através do sequenciamento dos genes RNAr 16S e COI do DNAm .
- 2) Produzir informações genéticas que possam auxiliar o delineamento de programas de manejo mais adequados para os plantéis estudados, contribuindo para a sustentabilidade da atividade de cultivo.



MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material

Os exemplares utilizados no presente trabalho são procedentes de cinco plantéis de reprodutores de *L. vannamei* (Tabela 1) pertencentes ao laboratório de produção de pós-larva Aquatec, localizado no estado do Rio Grande do Norte. Animais da espécie *F. subtilis*, cedidos pela EMPARN (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte), foram utilizados como grupo externo.

Tabela 1: Plantéis de reprodutores de *L. vannamei* utilizado, com suas respectivas origens e gerações de cultivo.

I. Plantel	II. Geração	III. Origem
Aqua-044	F ₃	Diferentes plantéis da Aquatec (formados por animais provenientes do Panamá) em diversas fases de cultivo e Lusomar (fazenda localizada na Bahia)
Aqua-045	F ₄	Diferentes plantéis da Aquatec (formados por animais provenientes do Panamá) em diversas fases de cultivo, Lusomar e Camanor (fazenda localizada no Rio Grande do Norte)
Aqua-046	F ₁	Diferentes plantéis da Aquatec (formados por animais provenientes do Panamá) em diversas fases de cultivo, Lusomar e Secom (fazenda localizada no Ceará)
Aqua-051	F ₁	Diferentes plantéis da Aquatec (formados por animais provenientes do Panamá) em diversas fases de cultivo e Secom
Aqua-Ven	F ₁₇	Fazendas da Venezuela

Dois indivíduos de cada plantel de *L. vannamei* e dois da espécie *F. subtilis* foram utilizados para o seqüenciamento do gene RNAr 16S, e cinco

animais de cada plantel, incluindo *F. subtilis*, foram usados para as análises da região COI, com exceção do plantel Aqua-045, para o qual foram utilizados 4 indivíduos.

Amostras de pleópodos de todos os exemplares foram coletadas e mantidas em 1 ml de etanol absoluto para serem transportadas para o Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP. O material fixado foi mantido em freezer, a uma temperatura de -20°C , até o momento da realização da extração de DNA. Os tecidos não utilizados na extração de DNA foram estocados no Banco de Tecidos do Laboratório.

3.2 Extração de DNA de tecidos sólidos

O DNA genômico total foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações.

Pequenos pedaços de tecido (aproximadamente 20 mg) foram macerados em cadinho com a ajuda de nitrogênio líquido. Posteriormente, adicionou-se 5 ml solução de digestão (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,1 M, EDTA 0,025M (pH 8,0), SDS 0,5%, RNase 0,1 mg/ml). Esta solução foi transferida para tubos plásticos de 15 ml e mantida em banho-maria (42°C) por uma hora e meia. Para digestão das proteínas acrescentou-se 0,1mg/ml de Proteinase K e o tubo foi mantido em banho-maria (50°C) por um período de duas a quatro horas. A primeira lavagem foi realizada adicionando-se igual volume da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25: 24: 1). O produto foi homogeneizado

durante 15 minutos, centrifugado por mais 15 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Posteriormente, precipitou-se o DNA através do acréscimo de 1 M de NaCl e dois volumes de etanol 100% gelado e homogeneização do material. Após centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm o sobrenadante foi descartado. Uma nova lavagem foi realizada adicionando-se 5 ml de etanol 70%. O produto foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Após secagem em estufa 37°C “overnight”, o material foi dissolvido em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0), sendo posteriormente transferido para tubo plástico de 1,5 ml e acondicionado em freezer a uma temperatura de -20 °C.

O DNA foi quantificado em gel de agarose (0,8%), contendo brometo de etídio (10 mg/ml).

3.3 Amplificação do gene RNAr 16S

Para amplificação da região RNAr 16S foram utilizados os “primers” 16Sar (5'-GCCTGTTTAACAAAAACAT-3') e 16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'), descritos por Simon et al. (1991). Na reação de PCR utilizou-se volume final de 50 µl, contendo solução tampão (1x), 5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTPs, 4 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase, 50 ng de DNA genômico e 50 ng de cada “primer”. O termociclador foi programado com 5 minutos de desnaturação inicial a 93°C, seguido de 30 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 93°C, 30 segundos de hibridização a 50°C e 45 segundos de extensão a 72°C. A fase de extensão final foi de 5

minutos a 72°C. 3 µl dos produtos de amplificação foram submetidos a uma quantificação e qualificação em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/ml). Para o registro dos géis utilizou-se o sistema Kodak EDAS 290 de fotodocumentação.

3.4 Amplificação do gene COI

Para o estudo da região COI foram utilizados os "primers" CO9 (5' - TTCGGTTCA(T/C)CCAGAAGT(C/A)TAT - 3') e CO10 (5' - TAAGCGTCTGGGTAGTCTGA(A/G)TA(T/G)CG - 3'), descritos em Baldwin et al. (1998). A reação de PCR foi efetuada em um volume final de 25 µl contendo solução tampão (1x), 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTPs, 200 nM de cada "primer", 3 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase e 10 ng de DNA genômico. O programa utilizado para amplificação consistiu de 3 minutos de desnaturação inicial a uma temperatura de 94°C, seguida de 35 ciclos que compreenderam desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridização (1 minuto a 45°C) e extensão (1 minuto a 72°C). A extensão final se deu em 5 minutos a 72°C. Para quantificação e qualificação dos produtos de amplificação, 3 µl dos mesmos foram aplicados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/ml). Os géis foram fotodocumentados através do sistema Kodak EDAS 290.

3.5 Purificação dos produtos de PCR

Todos os produtos de amplificação foram purificados em uma coluna de purificação utilizando o kit “Wizard PCR Preps DNA Purification System” (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos

Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pGEM-T utilizando o kit “pGEM-T Easy System II” (Promega). Para a reação de ligação foram utilizados 3 µl (~150 ng) do produto de amplificação purificado, 1 µl de T4 DNA ligase (1U), 5 µl de tampão de ligação 10x e 1 µl do plasmídeo “pGEM-T Easy” (50 ng). Os tubos foram mantidos “overnight” a 16°C.

Para a transformação foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5α. Em um tubo plástico de 1,5 ml foram adicionados 100 µl de bactéria competente, juntamente com 2 µl do produto de ligação. Esse material foi mantido no gelo por 20 minutos e transferido, posteriormente, para um banho-maria a temperatura de 42°C, onde permaneceu por 50 segundos. Após esse período o tubo foi novamente colocado no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 950 µl de meio líquido LB (peptona 1%, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5%, pH 7,5). O tubo foi mantido a 37°C por uma hora e meia, sob agitação constante em Incubadora de Bancada com agitação (Cientec). Centrifugou-se o material por 5 segundos a 13.000 rpm. O produto transformado foi espalhado em uma placa de Petri previamente preparada com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0,17 M, extrato

de levedura 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,5), contendo 1 µl de ampicilina (50 mg/ml) por ml de meio, 50 µl de IPTG 2.3% e 100µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase) a 2% por placa. As placas foram mantidas “overnight” em estufa a 37°C. A seleção das colônias recombinantes (colônias brancas) foi feita visualmente. Estas colônias foram submetidas a uma reação de PCR para verificação da presença do inserto no plasmídeo. As amplificações foram realizadas utilizando-se os “primers” M13 “Forward” e “Reverse”. O programa para amplificação consistiu de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 40 segundos, hibridização a 55°C por 40 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto.

Os clones recombinantes portadores dos fragmentos desejados foram selecionados em gel de agarose 1%. As mini preparações de plasmídeos foram realizadas através do método de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). As colônias selecionadas foram colocadas em 5 ml de meio LB e mantidas, “overnight”, a 37°C em Incubadora de Bancada com agitação (Cientec). Transferiram-se 1,5 ml desta cultura para um tubo plástico e centrifugou-se por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido. Adicionaram-se 200 µl da solução I (RNase 0,4 mg/ml, Tri-HCl 100 mM, EDTA 10 mM) e a solução foi homogeneizada em vortex. Foram adicionados 200 µl da solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) e inverteu-se o tubo cuidadosamente por algumas vezes. 200 µl da solução III (acetato de potássio 3 M/ml, ácido acético 0,09%) foram adicionados ao tubo. Centrifugou-se a solução por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 420 µl de isopropanol 100%. A solução foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante descartado.

Acrescentaram-se 200 µl de etanol 70%, centrifugou-se por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. 200 µl de etanol 100% foram adicionados ao tubo, a solução foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O material foi mantido a 37°C até secar totalmente. Ressuspendeu-se o produto em 20 µl de água.

Os plasmídeos foram seqüenciados de acordo com o método de Sanger (1977), utilizando-se o kit "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Pharmacia Biotech). Primeiramente realizou-se uma reação de PCR utilizando-se 2 µl de tampão Sove Money (Tris 200 mM, pH 9.0, MgCl₂ 5 mM), 2 µl de "premix" ET DYE, 10 pmoles de "primer" (M13 "Foward" ou M13 "Reverse"), 200 a 600 ng do DNA molde (plasmídeo com inserto). O programa utilizado para amplificação consistiu de 2 minutos de desnaturação inicial a uma temperatura de 96°C, seguida de 35 ciclos que compreenderam desnaturação (25 segundos a 96°C), hibridização (30 segundos a 50°C) e extensão (1 minuto a 60°C). O DNA foi precipitado utilizando-se 1/10 do volume de acetato de sódio/EDTA e 40 µl de etanol 95%. A solução foi homogeneizada em vórtex. O produto foi transferido para tubo de 1,5 ml e mantido em temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugou-se o material por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 150 µl de etanol 70%. Centrifugou-se novamente o material por 15 minutos a 13.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. O tubo com "pellet" foi incubado por uma hora em estufa a 37°C. Foram utilizados 3 µl de "loading buffer" para ressuspender o "pellet". O produto foi analisado em um seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems Inc.).

Para o seqüenciamento do gene RNAr 16S utilizou-se apenas uma das fitas de DNA. Já o gene COI foi seqüenciado através da utilização das duas fitas.

3.7 Análise dos dados

As seqüências obtidas a partir de três clones de cada uma das amostras analisadas foram alinhadas para a obtenção de uma seqüência consenso por indivíduo. O alinhamento se deu através do “site” Multalin (Corpet, 1988), sendo que a confirmação foi realizada por inspeção visual. Posteriormente, as seqüências consenso geradas para cada indivíduo foram alinhadas, obtendo-se assim, uma única consenso para cada plantel. Estas seqüências foram utilizadas para análises de distância genética e para a construção de dendrogramas com base no algoritmo de agrupamento de vizinhos “Neighbor-Joining” (Saitou e Nei, 1987) e na proporção de diferenças nucleotídicas entre os pares de seqüências (distância p). Testes de “bootstrap” (Felsenstein, 1985) de 1.000 replicações foram realizados para a árvore NJ construída; os valores acima de 50 (50%) foram considerados significativos. Os cálculos foram feitos usando a versão 2.1 do programa computacional Mega (Kumar et al., 1994), e a versão 3 do programa DNAsp (Rozas e Rozas, 1999).

Seqüências da porção 3' final do gene RNAr 16S de quatro indivíduos de *L. vannamei* depositadas no GenBank sob os números de acesso AF192087, AF192088, AF192089 (Maggioni et al., 2001) e AY264914 (Quan, J., Zhuang ,Z., Deng ,J., Dai, J. e Zhang, Y; dados não publicados) foram

utilizadas para o alinhamento (através do “site” Multalin) com as seqüências consenso de RNAr 16S obtidas no presente trabalho, referentes a cada plantel estudado. Contudo, esse alinhamento envolveu uma porção menor do gene (485 pb) devido ao fato das seqüências depositadas no GenBank apresentarem um tamanho menor. Também foi realizado o alinhamento de uma seqüência do gene COI de um indivíduo de *L. vannamei*, depositada no GenBank sob o número de acesso AY264901 (Quan, J., Zhuang ,Z., Deng ,J., Dai, J. e Zhang, Y; dados não publicados) com as seqüências consenso do mesmo gene, obtidas neste trabalho, referentes a cada um dos plantéis analisados. Utilizou-se um fragmento com a mesma extensão das seqüências consenso dos plantéis.



RESULTADOS

4.1 Análises das seqüências do gene RNAr 16S

As análises da região RNAr 16S evidenciaram, na amplificação, fragmentos correspondentes a, aproximadamente, 600 pb pertencentes à porção 3' final do gene. Estes fragmentos foram seqüenciados e 529 pb foram selecionadas para o alinhamento das seqüências (Figura 1). As seqüências consenso de cada um dos indivíduos foram depositadas no banco de dados do "GenBank" sob os seguintes números de acesso: AY344183 a AY344192 para a espécie *L. vannamei*, e AY344193 e AY344194 para *F. subtilis*.

Foram encontrados dois haplótipos entre as seqüências obtidas para a região RNAr 16S. Um único haplótipo foi compartilhado entre todos os plantéis de *L. vannamei*, o outro caracterizou os indivíduos de *F. subtilis*. Não foram observadas inserções/deleções e mutações entre as seqüências dos cinco plantéis de *L. vannamei* estudados. A diversidade nucleotídica total e as distâncias genéticas obtidas entre esses plantéis foram iguais a zero, contrastando com a distância de 8,2% obtida entre as duas espécies (*L. vannamei* e *F. subtilis*).

A composição média de nucleotídeos obtida para os fragmentos do gene RNAr 16S foi de A = 31,8%, C = 14,6%, G = 21,6% e T = 32,1%. Quando *F. subtilis* foi incluída nas análises a composição manteve-se praticamente a mesma (A = 32%, C = 14,6%, G = 21,5% e T = 32%).

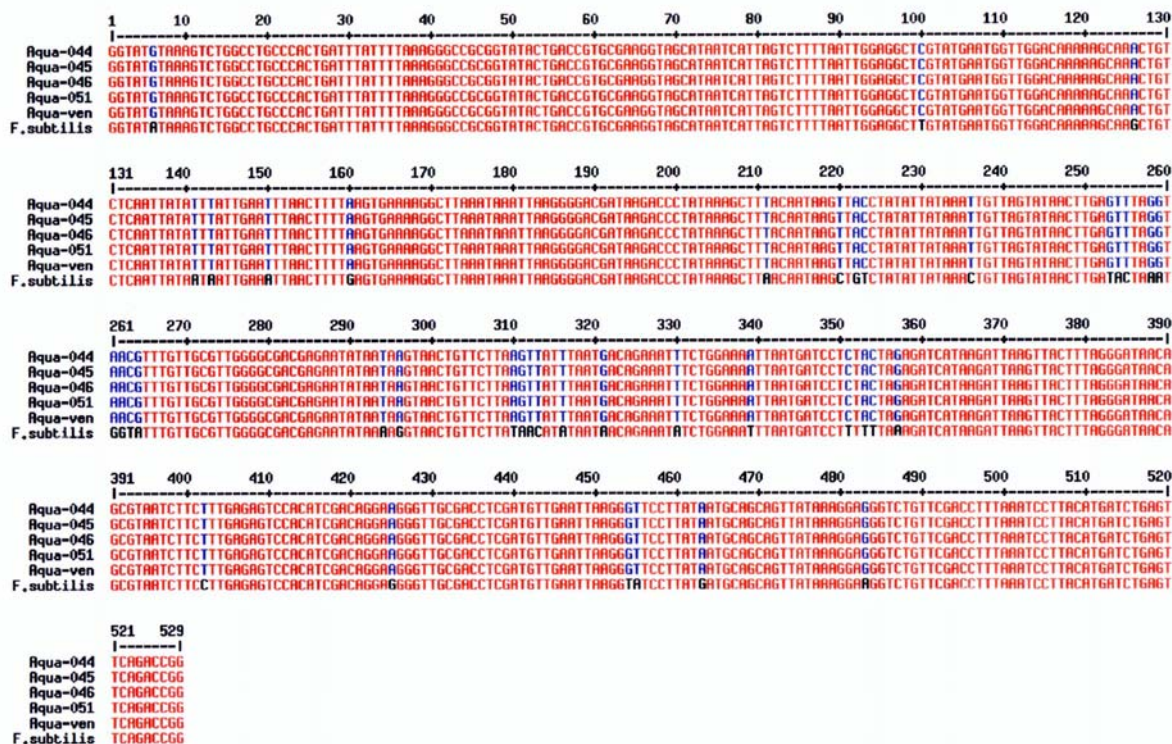


Figura 4: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven e da espécie *F. subtilis*, referentes ao gene rRNA 16S.

No alinhamento das seqüências do gene rRNA 16S de *L. vannamei* obtidas no presente trabalho com aquelas anteriormente depositadas no “GenBank” (Figura 2) também não foram observadas divergências nucleotídicas.

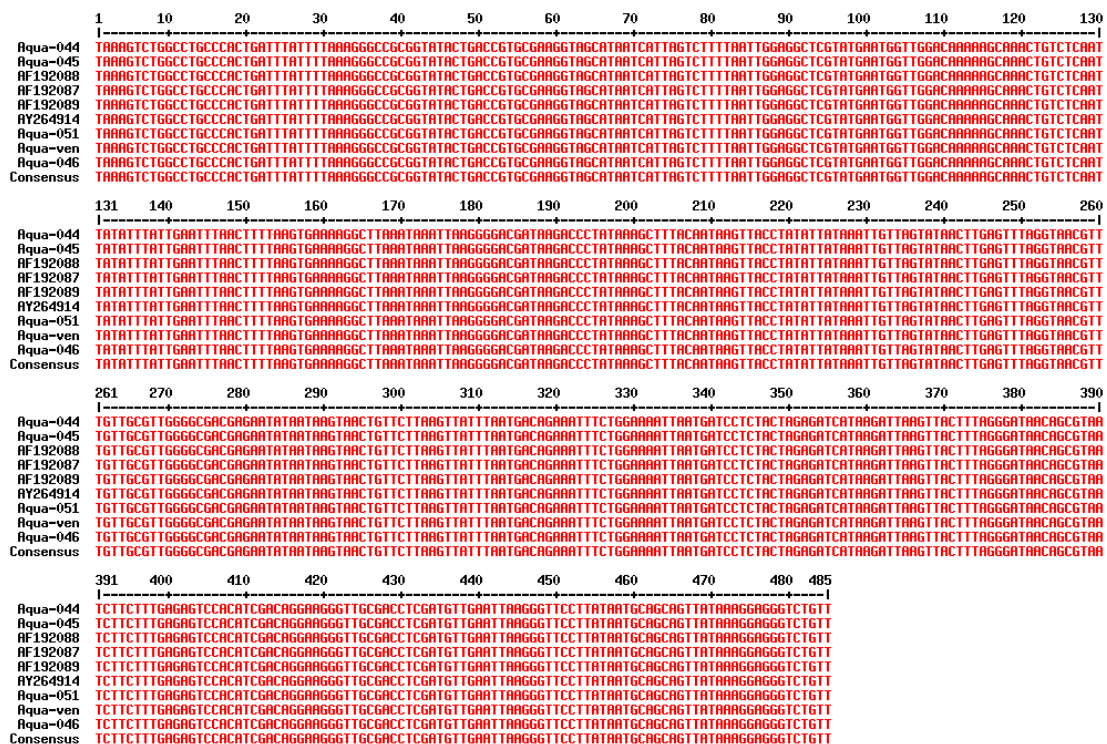


Figura 5: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven e das quatro seqüências obtidas do “GenBank” (AY264914, AF192087, AF192088 e AF192089), referentes ao gene RNAr 16S.

Devido ao fato dos plantéis não apresentarem divergências, no dendrograma obtido a partir das análises das seqüências do gene RNAr 16S (Figura 3) observou-se uma maior homogeneidade entre as amostras. Apesar de terem sido formados dois agrupamentos, os valores de “bootstrap” obtidos não foram significantes (< 50), não permitindo a confirmação das relações genéticas estabelecidas nos agrupamentos.

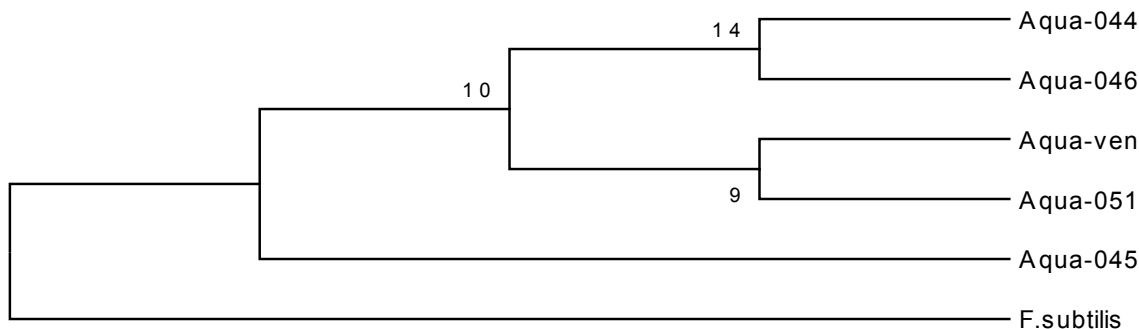


Figura 6: Dendrograma baseado no algoritmo “Neighbor-Joining” e no método de distância p obtidos a partir de seqüências do gene RNAr 16S, relacionados aos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, além da espécie *F. subtilis* (os números acima dos braços representam os valores de “bootstrap”).

4.2 Análises das seqüências do gene COI

Um fragmento de aproximadamente 650 pb da porção 3' final do gene COI foi amplificado e seqüenciado. 600 pb foram utilizados para o alinhamento das seqüências (Figura 1). As seqüências consenso de cada um dos indivíduos foram depositadas no “GenBank” sob os números de acesso AY344200 a AY344223 para a espécie *L. vannamei*, e AY344195 a AY344199 para *F. subtilis*.

No alinhamento das seqüências consenso dos cinco plantéis analisados observou-se 9 sítios polimórficos (mutações) e 9 sítios de inserções/deleções. Foram encontrados cinco haplótipos em *L. vannamei* (um para cada plantel) e um em *F. subtilis*. A diversidade nucleotídica total encontrada foi de 0,00745.

As seqüências obtidas para o gene COI foram compostas, em média, por T = 38.5%, C = 18%, A = 26.95 e G = 16.6%. A composição permaneceu praticamente a mesma quando as seqüências de *F. subtilis* foram incluídas nas análises (T = 38.6%, C = 17.9%, A = 27% e G = 16.5%).

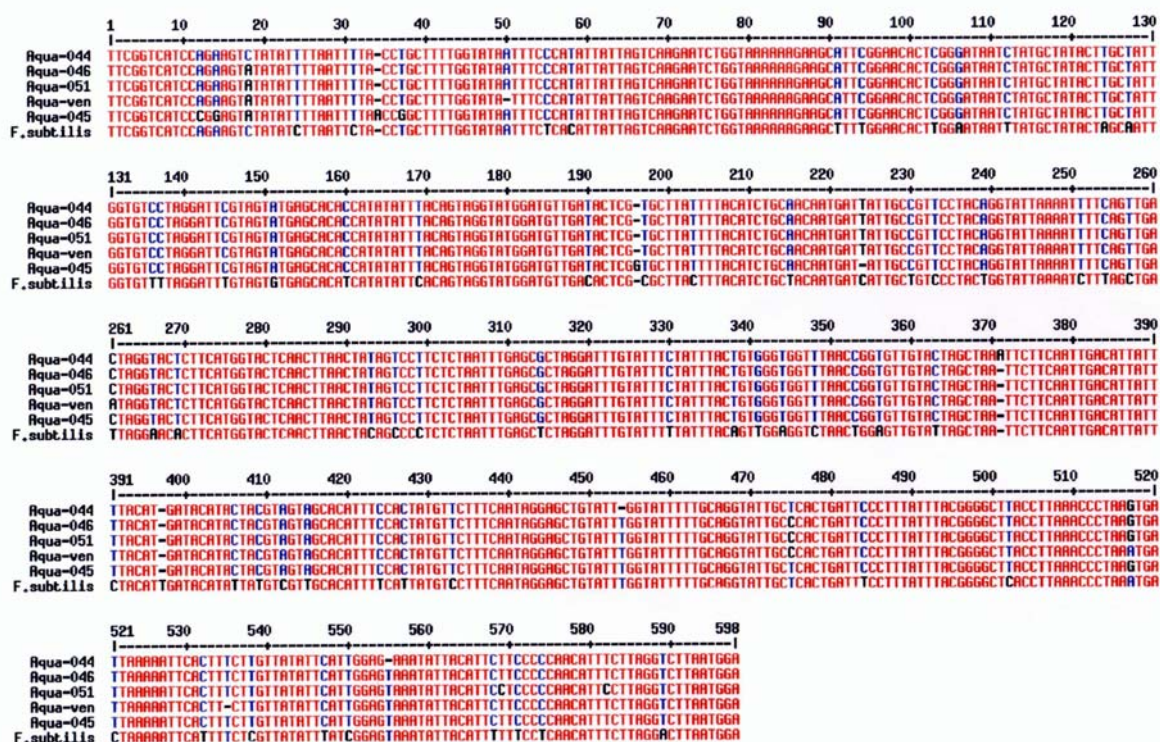


Figura 4: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven e da espécie *F. subtilis*, referentes ao gene COI.

No alinhamento entre as seqüências do gene COI de *L. vannamei*, obtidas no presente trabalho, e uma outra seqüência da mesma região e mesma espécie depositada no “GenBank” (Figura 5) pôde-se observar que a

seqüência obtida do GenBank também apresentou alguns nucleotídeos diferentes dos demais, como no resultado obtido com as análises dos cinco plantéis estudados.

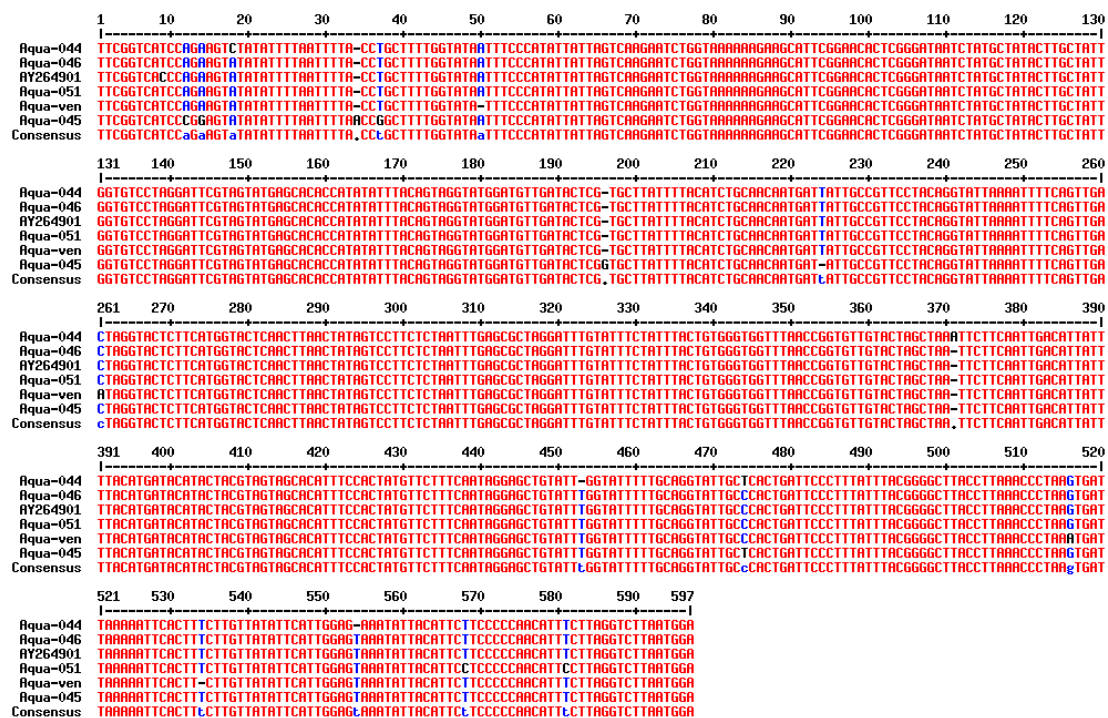


Figura 5: Alinhamento das seqüências consenso dos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051, Aqua-ven e da seqüência obtida do “GenBank” (AY264901), referentes ao gene COI.

O nível de divergência obtido entre os plantéis de *L. vannamei*, para as análises da região COI, variou de 0,34% entre Aqua-046 e Aqua-051 a 1,34% entre Aqua-051 e Aqua-045, contrastando com a distância média de, aproximadamente, 11% obtida entre *L. vannamei* e *F. subtilis* (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de distância genética obtidos a partir da análise de seqüências do gene COI. Acima da diagonal encontram-se os valores de desvio padrão.

Distância Genética e Desvio Padrão						
<i>Plantéis</i>	Aqua-044	Aqua-046	Aqua-051	Aqua-ven	Aqua-045	<i>F. subtilis</i>
Aqua-044	-	0.0029	0.0040	0.0035	0.0033	0.0124
Aqua-046	0.0051	-	0.0023	0.0023	0.0036	0.0125
Aqua-051	0.0101	0.0033	-	0.0033	0.0046	0.0127
Aqua-ven	0.0084	0.0034	0.0067	-	0.0042	0.0125
Aqua-045	0.0067	0.0084	0.0134	0.0118	-	0.0127
<i>F. subtilis</i>	0.1064	0.1094	0.1128	0.1081	0.1113	-

O dendrograma construído a partir de seqüências do gene COI (Figura 6) apresentou dois agrupamentos: um deles contendo os plantéis Aqua-051 e Aqua-046 e o outro contendo os plantéis Aqua-044 e Aqua-045. Os dois agrupamentos foram bem suportados pelo teste "bootstrap" (86 e 58, respectivamente).

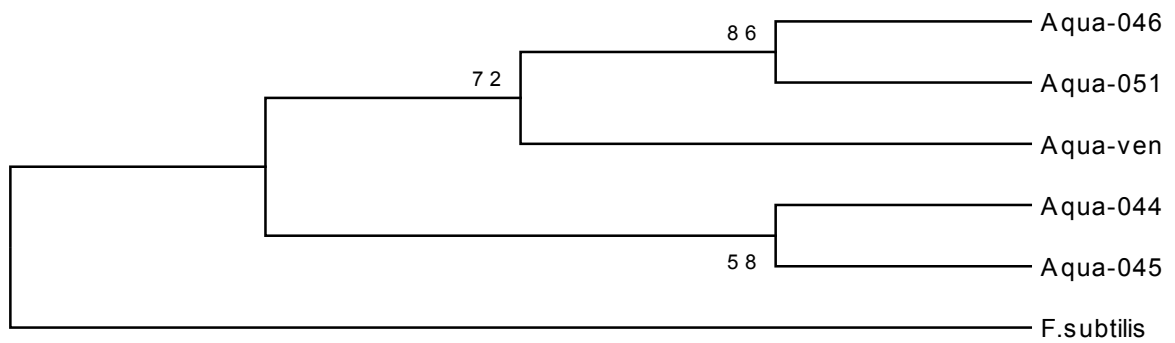
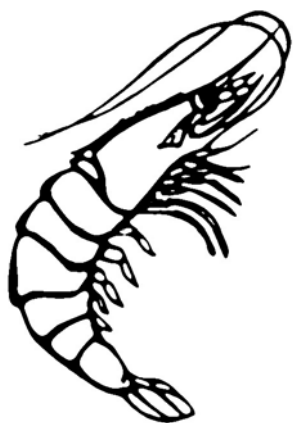


Figura 6: Dendrograma baseado no algoritmo “Neighbor-Joining” e no método de distância p obtido a partir de seqüências do gene COI, relacionados aos plantéis Aqua-044, Aqua-045, Aqua-046, Aqua-051 e Aqua-ven, além da espécie *F. subtilis* (os números acima dos braços representam os valores de “bootstrap”).



DISCUSSÃO

A utilização de uma espécie exótica pela grande maioria das fazendas de cultivo de camarão brasileiras determinou a ocorrência de diferentes procedimentos para a formação dos estoques de reprodutores. Assim, estes plantéis podem apresentar diferenças ou similaridades entre si, refletindo suas respectivas origens e histórias de deriva genética, decorrentes de suas populações fundadoras. O estudo das relações genéticas entre esses estoques pode gerar informações extremamente úteis para auxiliar um manejo mais adequado dos mesmos.

Relações genéticas distintas entre os diferentes plantéis estudados puderam ser observadas somente através da análise da região COI. Embora as análises do gene RNAr 16S tenham sido capazes de distinguir haplótipos entre *L. vannamei* e *F. subtilis*, elas não puderam discriminar diferenças genéticas entre os plantéis de *L. vannamei*, uma vez que os valores de “bootstrap” obtidos para os agrupamentos formados não foram significativos. A região RNAr 16S, por apresentar pequenas taxas de evolução, é mais conservada (Meyer, 1994). Estima-se que haja uma divergência de 4 - 6% entre espécies do mesmo gênero para alguns Artropoda (Simon et al., 1994). Esta característica deste gene garante uma maior sensibilidade para a discriminação entre espécies do que dentro de espécies. Em camarão, por exemplo, o seqüenciamento da região RNAr 16S, permitiu a caracterização de um morfotipo de camarão rosa, usualmente identificado como *F. subtilis*, o qual apresentou características genéticas diferentes, podendo ser classificado como uma nova espécie (Maggioni et al., 2001). Contudo, os autores observaram somente pequenas diferenças entre as seqüências de indivíduos desse

morfotipo, coletados em uma grande extensão geográfica da costa brasileira. As pequenas taxas de evolução apresentadas por esta região podem determinar a ocorrência de pouca ou nenhuma diferenciação entre seqüências de indivíduos pertencentes a uma mesma espécie. A homogeneidade apresentada entre as seqüências dos plantéis de *L. vannamei*, através da análise do gene RNAr 16S, pode, portanto, ser devida ao padrão conservado dessa região, mas o efeito da utilização de um pequeno número de indivíduos não pode ser descartado. Da mesma maneira, o comportamento conservado não permitiu diferenciações entre as seqüências aqui obtidas e aquelas retiradas do “GenBank”. No entanto, foram observadas divergências entre *L. vannamei* e *F. subtilis* (utilizado como grupo externo), visto que se encontrou uma distância significativa entre as duas espécies.

As divergências genéticas encontradas com a análise do gene COI foram substancialmente maiores que aquelas apresentadas pela região RNAr 16S. A taxa de substituição apresentada pela região COI é um pouco mais elevada, permitindo a detecção de diferenças genéticas entre populações da mesma espécie (Lee, 2000; Conn, 1998; Gusmão et al., 2000), e pode explicar a ocorrência de divergências genéticas tanto entre as seqüências dos cinco plantéis de *L. vannamei* estudados quanto entre estas e aquela retirada do “GenBank”. O nível de divergência nucleotídica obtido (0,7%) foi relativamente baixo se comparado com a taxa de divergência nucleotídica (0 a 3%) encontrada dentro de 14 espécies (inclusive *L. vannamei*) estudadas por Baldwin et al. (1998). No entanto, as seqüências obtidas no presente trabalho apresentaram diversidade nucleotídica suficiente para determinar a presença

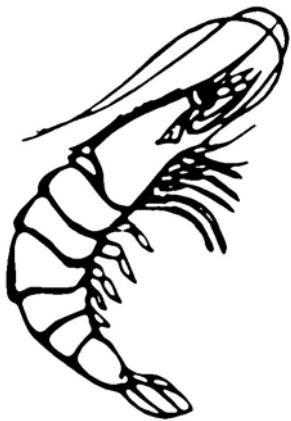
de um haplótipo por plantel, bem como produzir distâncias genéticas significativas entre eles (0,34 – 1,34%). Gusmão et al. (2000) encontraram distâncias genéticas médias de 0,14% entre indivíduos da espécie *F. paulensis*, 0,27% para *F. brasiliensis* e 0,36% para o morfotipo II de *F. subtilis*, através do seqüenciamento do gene COI. A maior divergência intraespecífica encontrada pelos autores foi de 1,26% entre dois haplótipos raros do morfotipo I de *F. subtilis*; este resultado está muito próximo da maior distância genética (1,34%) obtida entre os plantéis analisados no presente trabalho.

No dendrograma construído a partir do seqüenciamento do gene COI foi observada a presença de dois agrupamentos diferenciados. Uma provável explicação para o agrupamento obtido entre os plantéis Aqua-051 e Aqua-046 pode decorrer do fato deles possuírem origem comum. Os indivíduos que formaram estes plantéis são, em sua maioria, originados de uma fazenda localizada no estado do Ceará (Secom). O agrupamento obtido entre os plantéis Aqua-045 e Aqua-044 também pode ser explicado por uma origem comum, uma vez que estes plantéis foram formados, em sua grande maioria, por animais provenientes do Panamá, o que estaria, provavelmente, determinando uma maior proximidade entre eles.

Por sua vez, Aqua-ven estava em uma fase de domesticação avançada e se constituía numa linhagem formada por reprodutores obtidos da Venezuela já na 17^a geração. Freitas e Galetti (2002), em um estudo sobre a variação genética desse plantel, utilizando primers de VNTR, detectaram uma baixa variabilidade genética, a qual foi atribuída à elevada taxa de endocruzamentos e ao pequeno número de indivíduos utilizados como reprodutores para originar

as gerações seguintes. Embora esse plantel apareça próximo ao agrupamento formado pelos plantéis Aqua-046 e Aqua-051, a reduzida variabilidade genética, previamente detectada no estudo de VNTRs, presente neste plantel pode ser um indicador de sua diferenciação.

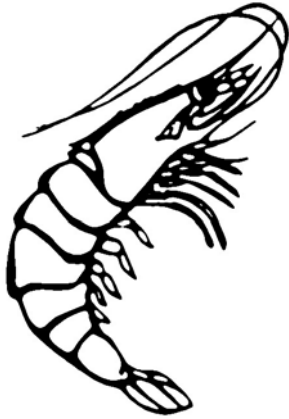
Nas diferentes fazendas de cultivo de camarão do Brasil um dos grandes problemas é a falta de conhecimento genético para o planejamento de um manejo adequado dos plantéis. O conhecimento da heterogeneidade dentro e entre estoques possibilita minimizar os efeitos deletérios do endocruzamento através do delineamento apropriado dos cruzamentos (Allegrucci et al., 1998). Análise de origem ou parentesco pode ser uma ferramenta extremamente útil para auxiliar o manejo de linhagens de cultivo (Sekino et al., 2002). Comumente, os plantéis de reprodutores de organismos aquáticos sofrem um forte efeito de “gargalo” e deriva genética no momento de sua formação, determinado pela participação de um pequeno número de indivíduos contribuindo para reprodução (tamanho efetivo populacional reduzido), podendo ocasionar a perda da variabilidade genética desses plantéis (Allegrucci et al., 1998). Os dados obtidos no presente estudo podem constituir-se numa ferramenta de grande utilidade para o delineamento de novos programas de manejo, visando promover a manutenção ou até mesmo um aumento da variabilidade genética desses plantéis, por exemplo, através do cruzamento entre plantéis geneticamente diferenciados. A diminuição da variação genética pode produzir efeitos extremamente prejudiciais à atividade de cultivo de camarões, como aumento de incidência de doenças, deformidades, e diminuição do tamanho do animal.



CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no presente trabalho através do seqüenciamento dos genes RNAr 16S e COI do DNAm_t pôde-se concluir que:

- 1) As divergências e composições nucleotídicas obtidas para as seqüências de ambas as regiões estudadas foram coerentes com aqueles presentes na literatura.
- 2) Os plantéis Aqua-046 e Aqua-051 possuem uma maior similaridade genética entre si, devido a uma origem comum e aos efeitos de deriva sofridos pelas populações fundadoras.
- 3) Os plantéis Aqua-044 e Aqua-045 também apresentaram maiores similaridades genéticas entre si, devido à origem comum.
- 4) O plantel Aqua-ven, embora tenha se apresentado mais próximo ao agrupamento formado entre os plantéis Aqua-046 e Aqua-051, parece estar diferenciado no conjunto dos plantéis de *L. vannamei*, por estar numa geração de cultivo mais avançada (F₁₇).
- 5) As informações obtidas no DNAm_t dos camarões podem ser de grande importância para o auxílio do delineamento de programas mais adequados de manejo dos reprodutores mantidos na carcinicultura.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRUCCI, I. G.; CESARONI, D.; VENANZETTI, F.; CATAUDELA, S.; SBORDONI, V. Length variation in mtDNA control region in hatchery stocks of European sea bass subjected to acclimation experiments. **Genet. Sel. Evol.**, v. 30, p. 275-288, 1998.

APTE, S.; STAR, B.; GARDNER, J. P. A. A comparison of genetic diversity between cultured and wild populations, and a test for genetic introgression in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin 1791). **Aquaculture**, v. 219, p. 193-220, 2003.

ARANA, L. V. **Aqüicultura e desenvolvimento sustentável. Subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira.** Editora da UFSC. 1999.

ARGUE, B. J.; ALCIVAR-WARREN, A. Genetics and breeding applied to the penaeid shrimp farming industry. In: **Controlled and biosecure production systems.** Preliminary proceedings of a special session integration of shrimp and chicken models. Sydney, Austrália. World Aquaculture Society, 1999.

AUBERT, H.; LIGHTNER, D. V. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. **Mar. Biol.**, v. 137, p. 875-885, 2000.

AVISE, J. C.; LANSMAN, R. A.; SHADE, R. O. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence retadness in natural populations I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetics**, v. 92, p. 279-295, 1979 a.

AVISE, J. C.; GIBLIN-DAVIDSON, C.; LAERM, J.; PATTON, J. C.; LANSMAN, R. A. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 6694-6698, 1979 b.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species.**

Harvard University Press. 2000.

BALDWIN, J. D.; BASS, A. L.; BOWEN, B. W.; CLARK, W. H. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 10, n. 3, p. 399-407, 1998.

BEARD, C. B.; HAMM, D. M.; COLLINS, F. H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae* DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequence of the others insects. **Insect Mol. Biol.**, v. 2, p. 103-124, 1993.

BENZIE, J. A. H.; BALLMENT, E.; FRUSHER, S. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. **Aquaculture**, v. 111, p. 89-93, 1993.

BENZIE, J. A. H.; KENWAY, M.; BALLMENT, E. Growth of *Penaeus monodon* X *Penaeus esculentus* tiger prawn hybrids relative to the parental species. **Aquaculture**, v. 193, p. 227-237, 2001.

BIOTECHNOLOGY-AQUACULTURE INTERFACE: The site of maximum impact workshop. Disponível em //A:\genoma camarão.htm. Acesso em 17 de janeiro de 2002.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucl. Acids Res.**, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, 1999.

BOUCHON, D.; SOUTY-GROSSET, C.; RAIMOND, R. Mitochondrial DNA variation and markers of species identify in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *Penaeus japonicus* Bate. **Aquaculture**, v.127, p.131-144, 1994.

BROWN, W. M.; GEORGE, M. Jr.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 1967-1971, 1979.

CALDERON, F. R. O.; SUN, P. S. Selection of transfection reagents for foreign DNA delivery into Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* embryos. In: World Aquaculture Society 2003 "Realizing the Potential Responsible Aquaculture for a secure future". Salvador. **Book of Abstracts**, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 2003. p. 146.

CAMPOS-RAMOS, R. Chromosome studies on the marine shrimps *Penaeus vannamei* and *P. californiensis* (Decapoda). **J. Crustacean Biol.**, v. 17, n. 4, p. 666-673, 1997.

CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **J. Mol. Evol.**, v. 22, p. 252-271, 1985.

CLAYTON, D. A. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 573-594, 1984.

CLAYTON, D. A. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. **Ann. Rev. Cell Biol.**, v. 7, p. 453-478, 1991.

CLAYTON, D. A. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. **Int. Rev. Cytol.**, v. 141, p. 217-232, 1992.

CHOW, S.; DOUGHERTY, W. J.; SANDIFER, P. A. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimp of the genus *Penaeus*. **J. Crustacean Biol.**, v. 10, n. 1, p. 29-36, 1990.

CHU, K. H.; TONG, J.; CHAN, T. Y. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 27, p. 461-468, 1999.

CONN, J. E. Systematics and population level analysis of *Anopheles darlingi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 647-650. 1998.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988. (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin.html>)

D'AMATO, M. E.; CORACH, D. Genetic diversity of populations of the fresh-water shrimp *Macrobrachium borellii* (Caridea: Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. **J. Crustacean Biol.**, v. 16, n. 4, p. 650-655, 1996.

DANIELS, S. R.; STEWART, B. A.; GOUWS, G.; CUNNINGHAM, M.; MATTHEE, C. A. Phylogenetic relationships of the southern African freshwater crab fauna (Decapoda: Potamonautidae: *Potamonautes*) derived from multiple data sets reveal biogeographic patterning. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 25, p. 511-523, 2002.

DHAR, A. K.; FAN, Y.; MURAYAMA-KAYANO, E.; KAYANO, T.; MEISNER, R.; CARR, W.; BRELAND, V.; LOTZ, J. Isolation of expressed sequence tags (ESTs) from Taura Syndrome Virus (TSV)-challenged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by mRNA differential display. **Book of Abstracts**, PAG III, San Diego, C A , 2000, p. 202.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approaching using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2^a ed. Brasília: Embrapa Cenargen. 1996.

FREITAS, P. D.; CALGARO, M. R.; de FRANCISCO, A. K.; GALETTI JR., P. M. Um pouco da genética dos nossos plantéis de reprodutores de *Litopenaeus vannamei*. **Revista da ABCC**, v. 3, n. 1, p. 20-24, 2001.

FREITAS, P. D.; GALETTI JR., P. M. PCR-based VNTR core sequence analysis inferring on genetic diversity of cultured prawn *Litopenaeus vannamei*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 431-434, 2002.

FUMAGALII, L.; MORITZ, C.; TABERLET, P.; FRIEND, J. A. Mitochondrial DNA sequence variation within the remnant populations of the endangered numbat (Marsupialia: Myrmecobiidae: *Myrmecobius fasciatus*). **Mol. Ecol.**, v. 8, p. 1545-1549, 1999.

GALETTI JR., P. M.; JESUS, C. M. Isolation and molecular characterization of microsatellite sequences os *Litopenaeus vannamei*. In: World Aquaculture Society 2003 "Realizing the Potential Responsible Aquaculture for a secure future". Salvador. **Book of Abstracts**, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 2003. p. 298.

GARCIA, K. D.; FAGGART, M. A.; RHOADES, L; ALCIVAR-WARREN, A.; WYBAN, J. A.; CARR, W. H.; SWEENEY, J. N.; EBERT, K. M. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, v. 3, n. 5, p. 270-280, 1994.

GARCIA, D. K.; BENZIE, J. A. H. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodom*) breeding programs. **Aquaculture**, v. 130, p. 137-144, 1995.

GARCIA, K. D.; DHAR, A. K.; ALCIVAR-WARREN, A. Molecular analysis of RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, v. 5, n. 1, p. 71-83, 1996.

GARCIA-MACHADO, E.; DENNEBOUY N.; SUAREZ M. O.; MOUNOLOU, J. C.; MONNEROT, M. Partial sequence of the shrimp *Penaeus notialis* mitochondrial genome. **R. Acad. Sci.**, p. 319, p. 473-486, 1996.

GARESSE, R.; CARRODEGUAS, J. A.; SANTIAGO, J.; PÉREZ, M. L.; MARCO, R.; VALLEJO, C. G. Artemia mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117B, n. 3, p. 357-366, 1997.

GENNIS, R. B. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter aphaeroides*: a brief review of progress to date. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1101, p. 184-187, 1992.

GRABOWSKI, M.; STUCK, K. C. Structure and intraspecific variability of the control region mtDNA in the pink shrimp, *Farfantepenaeus duorarum* (Decapoda, Penaeidae). In: **Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress**, Leiden: Koninklijke Briil NV, 1998. p. 332-344

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new specie of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Mar. Biol.**, v. 137, p. 435-446, 2000.

IGUCHI, K.; WATANABE, K.; NISHIDA, M. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multipe generations. **Aquaculture**, v. 178, p. 235-243, 1999.

JOHNS, D. R. Mitochondrial DNA and disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, n. 10, p. 638-644, 1995.

KARL, S. A.; AVISE, J. C. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implication for nuclear RFLPs. **Science**, v. 256, p. 100-102, 1992.

KLINBUNGA, S.; PENMAN, D. J.; McANDREW, B. J.; TASSANAKAJON, A. Mitochondrial DNA diversity in three population of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Mar. Biotechnol.**, v. 1, p. 113-121, 1999.

KLINBUNGA, S.; SILUDJAI, D.; WUDTHIJINDA, W.; TASSANAKAJON, A.; JARAYABHAND, P.; MENASVETA, P. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. **Mar. Biotechnol.**, v. 3, p. 428-438, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 10, p. 89-191, 1994.

LABACENA, M. E.; TORRES, M.; ESPINOSA, G. Variabilidad y distancia genetica en especies de *Penaeus*. **Rev. Invest. Mar.**, v. 15, n. 1, p. 80-87, 1994.

LEE, C. E. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "population". **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 2014-2027, 2000.

LESTER, J. L. Population genetics of penaeid shrimp from Gulf of Mexico. **J. Hered.**, v. 70, p. 175-180, 1979.

MACHADO, E. G.; DENNEBUOY, N.; SUAREZ, M. O.; MOUNOLOU, J. C.; MONNEROT, M. Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimp: Sequences variability and secondary structure. **Crustaceana**, v. 65, p. 279-286, 1993.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D.; MACLEAN, N.; D'INCAO, F. Molecular phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based

on mitochondrial 16S partial sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 18, n. 1, p. 66-73, 2001.

MEYER, A. **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**. Editor A. R. Beaumont. 1994.

MOORE, S. S.; WHAN, V.; DAVIS, G. P.; BYRNE, K.; HETZEL, D. J. S.; PRESTON N. The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 173, p. 19-32, 1999.

MOYSÉS, C. B. **Polimorfismo do DNA mitocondrial e estrutura de populações em *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 1999, 137 f. Dissertação (Mestrado em Biologia/Genética) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PALUMBI, R. S.; BENZIE, J. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, v. 1, p. 27-34, 1991.

PEREZ, J. E.; ROMERO, O. Z. Genetic improvement in crustacean. **Estud. Oceanol.**, v. 10, p. 131-137, 1991.

PERZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. Peaneoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world: Keys and diagnosis for the families and genera. **Mém. Mus. Natl. Hist. Nat.**, v. 175, p. 1-233, 1997.

PRESTON, N.; GREWE, P.; LEETON, L. Recent advances in the development and application of genetic manipulation techniques in shrimp. In: World Aquaculture Society 2003 "Realizing the Potential Responsible Aquaculture for a secure future", 2003, Salvador. **Book of Abstracts**, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 2003. p. 613.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; PRIOLI, R. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

ROCHA, I. O desafio da carcinicultura brasileira. **Revista da ABCC**, ano 5, n. 1, p. 6, 2003.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J. A. carcinicultura brasileira 2002. **Revista da ABCC**, ano 5, n. 1, p. 30-45, 2003.

ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, v. 15, p. 174-175, 1999.

SACCONE, C.; GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, p. 195-209, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SAMPAIO, Y.; COSTA, E. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, ano 5, n. 1, p. 60-64, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SARASTE, M. Structural features of cytochrome oxidase. **Q. Rev. Biophys.**, v. 23, p. 331-366, 1990.

SBORDONI, V.; DE MATHEIS, E.; COBOLLI-SBORDONI, M.; LA ROSA, G.; MOTTLCACCIA, M. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). **Aquaculture**, v. 57, p. 239-251, 1986.

SEKINO, M.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 213, p. 101-122, 2002.

SIMON, C.; FRANKE, A.; MARTIN, A. The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. **NATO ASI Ser.**, v. H57, p. 329-355, 1991.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SUNDEN, S. L. F.; DAVIS, S. K. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. **Aquaculture**, v. 97, p. 131-142, 1991.

TASSANAKAJON, A., SIRIPORN, P.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. 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.**, v. 6, n. 2, p. 110-115, 1997.

TASSANAKAJON, A., TIPTAWONNUKUL, A., SUPUNGUL, P., RIMPHANITCHAYAKIT, V. Isolation and characterization of microsatellite

markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.** v. 7, p. 55-61, 1998.

TONG, J.; LEHNERT, S. A.; BYRNE, K.; KWAN, H. S.; CHU, K. H. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: application in penaeid genetics. **Aquaculture**, v. 208, p. 69-79, 2002.

VERSPoor, E.; McCARTHY, E. M.; KNOX, D.; BOURKE, E. A.; CROSS, T. F. The phylogeography of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16S RNA region of the mtDNA. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 68, p. 129-146, 1999.

WAINBERG, A. A.; CAMARA, M. R. Brazilian Shrimp Farming. It's growing, but is it sustainable? **World Aquaculture**, p. 29-30. 1998.

WILSON, A. C.; OCHMAN, H.; PRAGER, E. M. Molecular time scale for evolution. **Trends Genet.**, v. 3, p. 241-247, 1987.

WILSON, K.; CAHILL, V.; BALLMENT, E.; BENZIE, J. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans more closely related to Insects than to Branchiopods? **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, p. 863-874, 2000.

WILSON, K.; LI, Y.; WHAN, V.; LEHNERT, S.; BYRNE, K.; MOORE, S.; PONGSOMBOON, S.; TASSANAKAJON, A.; ROSENBERG, G.; BALLMENT, E.; FAYAZI, Z.; SWAN, J.; KENWAY, M.; BENZIE, J. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. **Aquaculture**, v. 204, p. 297-309, 2002.

WOLSTENHOLME, D. R.; JEAN, K. W. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **Int. Rev. Cytol.**, v. 141, p. 173-216, 1992.

XU, Z.; WYRZYKOWSKI, J.; ALCIVAR-WARREN, A. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. **Anim. Genet.**, v. 30, p. 150-156, 1999.