

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES CULTIVADAS
DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM
PERNAMBUCO**

**RECIFE-PE
2007**

ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES CULTIVADAS
DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura**.

Orientador: **Dra. Maria Raquel Moura Coimbra**, Depto. de Pesca e Aqüicultura, da UFRPE.

**RECIFE-PE
Fevereiro, 2007.**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

L732e Lima, Ana Patrícia Souza de
Estrutura genética de populações cultivadas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em Pernambuco, Brasil / Ana Patrícia Souza de Lima. -- 2007.
83 f. : il.

Orientadora : Maria Raquel Moura Coimbra
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüi – cultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. De – partamento de Pesca e Aqüicultura.
Inclui anexo e bibliografia

CDD 639. 543

1. *Litopenaeus vannamei*
 2. Microsatélites
 3. Consangüinidade
 4. Variabilidade genética
 5. Pernambuco, BR
- I. Coimbra, Maria Raquel Moura
 - II. Título

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES CULTIVADAS DO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM PERNAMBUCO**

Área de concentração: **Aqüicultura**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA**
Como _____ .

Recife, _____ de Fevereiro de 2007.

Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra (UFRPE)
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (UECE)
Membro externo

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (UFRPE)
Membro interno

Prof. Dr. Silvio Ricardo Maurano Peixoto (UFRPE)
Membro interno

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia (UFRPE)
Suplente

Aos meus pais e irmã, por todo amor que sempre me dedicaram.

A Cláudio A. Generoso, por todo amor dedicado e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais uma conquista.

À minha orientadora, Prof^a Maria Raquel Moura Coimbra, por toda dedicação, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof. Rodrigo Maggioni, por ter cedido as instalações do NUGEN para complementação deste trabalho e por toda ajuda prestada.

Ao Prof Manoel Adrião, coordenador do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA, pelo livre acesso às instalações e ajuda proporcionada.

Ao Prof. Reginaldo, do Laboratório Genoma pelo suporte e colaboração.

Aos proprietários, gerentes e funcionários das larviculturas de camarão, nas quais realizei coletas, pela receptividade e colaboração.

Aos Amigos e companheiros de laboratório, Andréa, Suzianny, Ebenezer, Hozana, Henrique, Karine e Marília pela ajuda e dedicação para a realização deste trabalho.

As amigas, Ana Cristina Pinheiro, Cristina Generoso, Cristiane Generoso, Daniela Ferraz e Irlanda Aguiar por estarem sempre presentes em minha vida.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	ii
Lista de Figura	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução	10
2. Objetivos	13
2.1 Geral	
2.2 Específicos	
3. Revisão da literatura	14
3.1 Carcinicultura Marinha: Importância Mundial	14
3.2 Cenário da Carcinicultura Brasileira	15
3.3 Programas de melhoramento	17
3.4 Estudos em genética de populações de camarão (selvagens e de cultivo)	19
3.5 Marcadores moleculares utilizados em estudos populacionais	20
4. Artigo Científico	23
“Avaliação Genética de duas Larviculturas de Camarão Marinho <i>Litopenaeus Vannamei</i> do Estado de Pernambuco, Brasil.”	
5. Artigo Científico	43
“Monitoramento Genético na Reposição de Matrizes do Camarão Marinho <i>Litopenaeus Vannamei</i> em Pernambuco, Brasil”	
6. Referências bibliográficas	60
Anexos	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais produtores mundiais de camarão cultivado.	15
--	----

Artigo I

Tabela 1. Repetições, <i>primers Forward e reverse</i> e tamanho esperado (pb) para os cinco locus de microssatélites analisados.	28
---	----

Tabela 2. Variabilidade genética das populações de <i>Litopenaeus vannamei</i> de duas larviculturas para cinco loci.	32
---	----

Tabela 3. Índices de Wright (F_{IS} e F_{ST}) para as duas larviculturas de <i>L. vannamei</i> .	34
--	----

Tabela 4. Diferenciação genética das larviculturas por locus	34
--	----

Artigo II

Tabela 1. Variabilidade genética das populações monitoradas de <i>Litopenaeus vannamei</i> para 3 loci de microssatélites.	46
--	----

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

Figura 1. Histogramas das frequências dos alelos para cada locus de microssatélites do *L. vannamei* 34

Artigo II

Figura 1. Histogramas das frequências dos alelos para cada locus de microssatélites do *L. vannamei* 48

RESUMO

Desde 1997 a introdução de novos reprodutores de *Litopenaeus vannamei* está proibida pelo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Portaria de nº. 119, o que levanta questões sobre a viabilidade de programas de melhoramento no Brasil, uma vez que não há mais renovação dos plantéis. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar geneticamente duas larviculturas de *Litopenaeus vannamei* e monitorar a variabilidade genética de uma das larviculturas, com reposição de matrizes, em três períodos sucessivos, ambas, localizadas no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. A caracterização genética foi feita usando 5 loci de microssatélites e um total de 100 amostras teciduais de reprodutores, para o monitoramento foram utilizados 3 loci de microssatélites e um total de 150 amostras teciduais de reprodutores. Foi evidenciado que há variabilidade genética suficiente nas duas larviculturas, para subsidiar programas de melhoramento genético, baseado na frequência dos alelos, nos coeficientes de endogamia F_{IS} (Larv. A = 0,380 e Larv. B = 0,250) e heterozigosidades que variaram de $H_o = 0,190$ a $0,810$ e $H_e = 0,460$ a $0,870$, respectivamente. Os resultados do monitoramento mostraram que a reposição de matrizes no sistema de ciclo fechado não interferiu na variabilidade genética desta larvicultura, o que pode ser evidenciado através da frequência dos alelos, nas heterozigosidades obtidas que foram de $H_o = 0,460$ e $H_e = 0,660$ na primeira coleta, de $H_o = 0,420$ e $H_e = 0,620$ na segunda coleta e de $H_o = 0,600$ e $H_e = 0,660$ na terceira coleta, e nos valores do coeficiente de endogamia F_{IS} (0,37 para a primeira coleta, 0,39 para a segunda coleta e 0,13 para a terceira coleta) encontrados. Os resultados aqui relatados podem ser considerados bons, refletindo a história da atividade no Brasil que se destacou pela introdução de reprodutores de diversas origens.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, SSR, STR, Consangüinidade, Variabilidade genética, Monitoramento.

ABSTRACT

Although Brazil has an an important position in the world shrimp farming industry scenario, information on the genetic basis of the most important species, the exotic *Litopenaeus vannamei*, still scarce. The Brazilian shrimp industry has been facing difficulties, such as US antidumping action against shrimp products, unfavorable currency exchange rate impacts and viruses outbreaks. Shrimp resistant to viral diseases, as well as with better growth rates are wanted in breeding programs for this species in Brazil. A Federal Normative Instruction, instituted in 1997, prohibited shrimp importation into Brazil as a sanitary precaution to prevent the spread of shrimp diseases, and since then, all shrimp broodstock rely on the domesticated stocks. This fact raises questions about the success of a breeding program on this species, because one can not know if the genetic variability is enough to guarantee selection response. The objective of this study was to genetically characterize the broodstock of two shrimp hatcheries and to monitor the genetic variability of one of them after three consecutive broodstock replacements in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. Genetic characterization of the two hatcheries was carried out using 5 microsatellite loci and pleopods tissue samples taken from 100 shrimp (50 of each broodstock). For the monitoring 3 microsatellite loci were used in 150 shrimp samples (50 of each broodstock replacement). Our results showed that there is sufficient genetic variability in both hatcheries based on the alleles frequency, inbreeding coefficient, F_{IS} (Larv. A = 0,380 e Larv. B = 0,250), and observed and expected heterozygosities ranging from $H_o = 0,190$ to $0,810$ and $H_e = 0,460$ to $0,870$, respectively. The monitoring results showed that in closed systems, broodstock replacement does not interfere in the genetic variability, based on the alleles frequency, observed and expected heterozygosities ($H_o = 0,460$ and $H_e = 0,660$ in first sample collection, $H_o = 0,420$ and $H_e = 0,620$ in the second sample collection and $H_o = 0,600$ and $H_e = 0,660$ in the third sample collection), inbreeding coefficient, F_{IS} (0,37 for the 1st, 0,39 for the 2nd and 0,13 for the 3rd sample collection). Our results suggested that genetic variability is high, thus reflecting the history of the shrimp activity in Brazil, where broodstock from different origins were introduced in the country up to 1997.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, Microsatellite Markes, Inbreeding Depression, Genetic Variability.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo de camarão marinho consolidou-se a partir da década de 80, com a introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*, nativa da Costa Pacífico do México, América Central e América do Sul. Apesar de se tratar de uma espécie exótica, o país possui o completo domínio de seu ciclo biológico, tecnologia de manejo operacional e dispõe de alimentos balanceados (ROCHA, 1999).

Segundo o censo coordenado pela Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC), o Brasil assumiu em 2003 o posto de principal produtor de camarão do hemisfério ocidental, que corresponde a aproximadamente 17% do total cultivado mundialmente. Dados de 2003 mostraram a existência de 997 fazendas de cultivo de camarão marinho no Brasil, perfazendo um total de 16.598 hectares de área em produção, sendo que 91% delas estão situadas na região nordeste, a qual é responsável por 95% da produção do país (ROCHA et al., 2004).

A atividade vem sofrendo impactos no Brasil, em função de questões comerciais internacionais como a aplicação de sobretaxas na exportação do camarão brasileiro, a chamada ação “anti-dumping”, movida por agências de pesca dos EUA, o incremento da produção de *L. vannamei* na Ásia, o câmbio desfavorável à importação e surtos virais, como a Mionecrose infecciosa. O vírus da Mionecrose infecciosa (IMNV) foi identificado no Nordeste e apontado como uma das causas para a diminuição da produção nacional em 2004 (LIGHTNER et al., 2004; PINHEIRO et al. 2007; RODRIGUES, 2005). Mais recentemente, a doença da Mancha Branca (WSSV-White Spot Syndrome Vírus) foi diagnosticada em Santa Catarina, acarretando sérios prejuízos para a região (PAREDES, 2005).

Camarões resistentes às infecções virais e com melhores taxas de crescimento que garantam alta produtividade são metas indispensáveis para

contrabalançar os baixos preços do mercado. Tais metas refletem a necessidade de investimentos em programas de melhoramento para esta espécie no Brasil.

Uma das formas de melhorar uma dada característica em uma população é eliminar os indivíduos com baixo desempenho naquela característica. Um dos obstáculos a esta abordagem é a perda potencial da diversidade genética oriunda da utilização de um número reduzido de reprodutores (SILVERSTEIN et al., 2004). A sustentabilidade de um programa de melhoramento depende, portanto, da variabilidade genética existente no conjunto original de reprodutores para a característica de interesse. Se a variabilidade genética é pequena desde o início ou se reduz ao longo das gerações, poderá ocorrer depressão endogâmica ou um decréscimo na resposta à seleção (KINGHORN, 1983; SU et al. 1996).

A caracterização molecular permite estimar parâmetros de grande importância para compreender a diversidade e a estrutura genética das populações e com isso direcionar as estratégias de conservação e exploração da variabilidade genética (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). A variabilidade genética pode ser medida e quantificada em análises moleculares, que permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados de marcadores moleculares. Dentre os marcadores mais informativos estão os de microssatélites, tendo em vista sua expressão co-dominante e o multialelismo, além de um alto conteúdo de informação polimórfica (PIC) (CURRAN, 1997).

O fato do *L. vannamei* ser uma espécie exótica, cuja introdução de novos reprodutores está proibida pelo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Portaria de nº. 119, de 17 de outubro de 1997, levanta questões sobre a viabilidade de programas de melhoramento no Brasil, uma vez que não há mais renovação dos plantéis.

A Rede de Carcinicultura do Nordeste (RECARCINE) foi criada em 2004, por iniciativa da FINEP, com o intuito de organizar sub-redes de pesquisadores no Nordeste capacitados a investigar temas estratégicos dentro da carcinicultura. A sub-rede de genética (RECARGENE) da RECARCINE, cujos participantes pertencem a diferentes instituições de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí, se propôs a avaliar a estrutura genética do germoplasma existente na região, a fim de diagnosticar a viabilidade de programas de melhoramento.

O Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco participa deste projeto como responsável pela avaliação das larviculturas de Pernambuco, genotipando matrizes com o uso de marcadores moleculares de microssatélites.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a variabilidade genética e os níveis de consangüinidade de duas larviculturas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, do estado de Pernambuco e monitorar a variabilidade genética de uma população cultivada com reposição de matrizes, visando à criação de bases para um programa de seleção de reprodutores.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar geneticamente, em termos de variabilidade e níveis de consangüinidade duas larviculturas do camarão marinho *L. vannamei*, no estado de Pernambuco, através de marcadores moleculares de microssatélites.
- Monitorar a variabilidade genética de uma larvicultura de *L. vannamei* do estado de Pernambuco, com reposição de matrizes, em três períodos sucessivos, através de marcadores moleculares de microssatélites.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Carcinicultura marinha: importância mundial

O cultivo do camarão marinho surgiu para satisfazer as necessidades de subsistência no sudoeste da Ásia, mantendo-se por séculos com características de produção artesanal. Em meados dos anos 30 no Japão, foi feita a primeira desova em laboratório de fêmeas capturadas do mar, para produção de pós-larvas em escala comercial (HUDINAGA, 1942). Em termos comerciais, o crescimento do cultivo de camarão marinho só se consolidou a partir da década de 80, tendo como base de sustentação o aprimoramento das tecnologias nutricionais, a crescente demanda do produto no mercado internacional, a boa rentabilidade do agronegócio e sua capacidade de gerar renda, empregos e divisas (ROCHA et al., 2004).

Em 2005, a carcinicultura mundial foi praticada em 2.220.000 hectares e com produção de 2.057.000 toneladas. O resultado econômico-social dessa atividade gerou uma receita de US\$ 12,0 bilhões de dólares e seis milhões de empregos para as populações litorâneas dos países produtores (ROCHA, 2005).

A maior parte da produção mundial provém do hemisfério oriental, tendo China, Tailândia, Vietnã, Indonésia e Índia como principais países produtores (Tabela 1). O camarão tigre asiático, *Penaeus monodon*, e o camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, são as duas espécies mais cultivadas e que predominam no mercado internacional, com cerca de 70% do volume ofertado (WWW.FAO.ORG / SHRIMP, ACESSO EM: DEZEMBRO, 2006).

Tabela 1. Principais produtores mundiais de camarão cultivado.

Principais países produtores	2005		
	Produção em toneladas	Área em produção (ha)	Produtividade (kg/ha/ano)
China	480.000	300.000	1360
Tailândia	325.000	64.000	5078
Vietnã	310.000	722.00	429
Indonésia	300.000	395.000	759
Índia	121.000	154.000	786
Equador	130.000	150.000	867
*America Central	82.000	40.000	2050
México	81.000	43.000	1884
Bangladesh	77.000	145.000	531
Brasil	65.000	16.000	4063
Filipinas	43.000	30.000	1433
Outros	125.000	161.000	776
Total	2.067.000	2.220.000	931

FONTE: GAA / SHRIMP OUTLOOK 2005 / FAO / GLOBEFISH

*America Central (Honduras, El Salvador, Guatemala, Belize, Nicaragua e Panamá)

3.2 Cenário da carcinicultura brasileira

No Brasil, os primeiros experimentos com camarão cultivado iniciaram-se na década de 70, tendo como espécie pioneira o *Marsupenaeus japonicus*, através da implementação do Projeto Camarão, uma iniciativa do governo do Rio Grande do Norte, para estudo da viabilidade do cultivo desse crustáceo em substituição à extração do sal. Contudo, a carência de aperfeiçoamento tecnológico acarretou no insucesso do cultivo (MAPA et al., 2001).

Posteriormente a falta de êxito com o *Marsupenaeus japonicus*, o setor da carcinicultura optou pela domesticação das espécies nativas, *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schimitti*. Da mesma forma,

durante 10 anos de cultivo, o desempenho produtivo desses indivíduos não foi satisfatório em termos financeiros (MAPA et al., 2001).

Na década de 80, o camarão *L. vannamei* foi introduzido no Brasil. Entretanto, somente em meados dos anos 90 os laboratórios brasileiros dominaram a reprodução e larvicultura dessa espécie, iniciando a distribuição comercial de pós-larvas e intensificando as validações tecnológicas nas fazendas de camarão, demonstrando assim, a supremacia desta espécie em relação às nativas (ROCHA, 2001).

No período de 1997 até 2003, o cultivo de camarão marinho *L. vannamei* no Brasil cresceu rapidamente, aumentando em 317% a área cultivada e um incremento na produtividade de 499% (ROCHA, 2004).

Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), a carcinicultura responde por 99% das exportações de camarão do Brasil. De 3,6 toneladas em 1997, a produção do setor saltou para 90.160 toneladas em 2003. A região Nordeste é responsável por 92% da produção brasileira de camarão cultivado, onde os estados do Rio Grande do Norte e do Ceará respondem, juntos, por 70%, seguidos por Bahia, Pernambuco e Piauí respectivamente (WWW.MERCADODAPESCA.COM.BR, ACESSO EM: DEZEMBRO, 2006).

Entretanto, o ano de 2004 foi marcado por uma crise no setor, quando a produção de camarão sofreu uma queda de 15,84%, passando para 75.904 toneladas e a produtividade caiu de 6.084 kg/ha/ano para 4.573 kg/ha/ano, com reduções nas exportações em 12,5% (MADRID, 2005). As exportações continuaram reduzindo nos anos de 2005 (24.567 toneladas) e 2006 (19.830 toneladas).

Vários fatores foram apontados como responsáveis por esta redução, entre eles, a aplicação de sobretaxas na exportação do camarão brasileiro, a ação “anti-

dumping”, movida por agências norte americanas de pesca, que provocou uma queda de 52% nas exportações brasileiras de camarão para os EUA; os preços baixos do camarão no mercado internacional; a desvalorização do dólar e o surto viral da Mionecrose infecciosa (WWW.REVISTARURAL.COM.BR, ACESSO EM: DEZEMBRO, 2006).

O aumento da susceptibilidade às doenças e reduzidas taxas de crescimento podem refletir baixos níveis de variabilidade genética para estas características (WOLFUS et al., 1997). Camarões resistentes às infecções virais e com melhores taxas de crescimento que garantam alta produtividade são metas indispensáveis para contrabalançar os baixos preços do mercado. A necessidade da sustentabilidade econômica reflete investimentos em programas de melhoramento para esta espécie no Brasil.

3.3 Programas de melhoramento

Programas de melhoramento são relativamente raros na aquicultura quando comparados à agropecuária. Entretanto, os benefícios são descritos para algumas espécies de peixe, incluindo o salmão do Atlântico (FRIARS, 1993; GJEDREM & FIMLAND, 1995), a tilápia do Nilo (EKNATH et al., 1993), a truta arco-íris (GJEDREM, 1992) e a carpa comum (BAKOS, 1979; WOHLFARTH et al., 1980).

Camarões peneídeos devem responder melhor às iniciativas de melhoramento com relação às espécies de peixe em função de sua alta fecundidade e reduzido intervalo de geração. Apesar disto, a indústria do camarão tem sido lenta em adotar programas de melhoramento. Esta relutância se deve, em parte, a percepções do passado, relativas à baixa variabilidade genética e a dificuldades nos processos de domesticação de espécies de camarão (PULLIN et al., 1998).

Os programas de melhoramento têm como objetivo modificar a média fenotípica de uma característica específica. Uma das formas de melhorar é eliminar os indivíduos com baixo desempenho naquela característica. Contudo, um dos obstáculos a esta abordagem é a perda potencial da diversidade genética oriunda da utilização de um número reduzido de reprodutores (SILVERSTEIN et al., 2004). A eficiência de um programa de melhoramento depende essencialmente da variabilidade genética existente no conjunto original de reprodutores para a característica de interesse. Se a variabilidade genética é pequena desde o início ou se reduz ao longo das gerações, então poderá ocorrer depressão endogâmica ou um decréscimo na resposta à seleção (KINGHORN, 1983; SU et al., 1996).

Diversos programas de melhoramento em peneídeos são descritos na literatura. Hetzel et al. (2000) relataram ganhos de seleção da ordem de 10% em uma única geração, sugerindo que ganhos genéticos são rápidos em *M. japonicus* e que a magnitude da resposta à seleção resulta da grande variabilidade fenotípica na população original. Ganhos de seleção desta magnitude também são encontrados em *L. vannamei* (GOYARD et al., 2002), e *L. stylirostris* (ARGUE et al., 2002) demonstrando a viabilidade da seleção dirigida em camarões.

O modo pelo qual se faz o cultivo de camarões no Brasil poderia influenciar antagonicamente na redução ou eliminação da variabilidade genética, pois o cultivo em pequenas populações propicia o cruzamento entre indivíduos aparentados e em consequência os ganhos de seleção podem não ser satisfatórios. Além disto, a proibição da importação de matrizes de camarão, instituída pelo IBAMA, Portaria de nº 119 de 17 de outubro de 1997, levanta questionamentos se há variabilidade genética suficiente para viabilizar programas de melhoramento de *L. vannamei* no país.

A perda da variabilidade genética em cultivos causada pela falta de renovação dos reprodutores do plantel e estratégias inadequadas de cruzamento foi relatada em cultivos de *L. stylirostris* (BIERNE et al., 2000), *Penaeus monodon* (XU et al., 2001), e *L. vannamei* no Equador (GARCIA et al. 1994) e México (WOLFUS et al., 1997).

3.4 Estudos em genética de populações de camarão (selvagens e de cultivo)

Em todo mundo muitos estudos de genética molecular foram realizados em camarões, como a análise estrutural e funcional de genes importantes (CHIOU et al., 2005; JARASRASSAMEE et al., 2005; LIU et al., 2005), o estudo do genoma mitocondrial (PODSIADLOWSKI E BARTOLOMAEUS, 2005) e o desenvolvimento de marcadores (CRUZ et al. 2002; MEEHAN et al., 2003). A análise do DNA foi usada para determinar os níveis da variação intraespecífica e diferenciação genética da população de diversas espécies de camarão (BENZIE, 2000; CRUZ et al., 2004; MAGGIONI et al., 2003; VALLES-JIMENEZ et al., 2005).

A deterioração genética aumenta com a diminuição do tamanho da população pelo efeito “*bottleneck*” ou “gargalo de garrafa” do estoque fundador, o que se deve a duas razões principais; pela consangüinidade e pela deriva genética (SBORDONI et al., 1986; BENZIE, 2000).

O conhecimento da variação genética intra-específica é fundamental para a utilização e conservação dos recursos genéticos naturais e da biodiversidade (TABERLET, 1998). Informações sobre a heterogeneidade dentro e entre estoques pela análise de relações genéticas entre plantéis de reprodutores possibilita minimizar os efeitos deletérios do endocruzamento, através do planejamento apropriado dos cruzamentos (ALLEGRUCCI et al., 1998; SEKINO et al., 2002).

Os estudos em genética de camarão iniciaram-se há 20 anos na Itália, com marcadores de aloenzimas (SBORDONI et al., 1986). No Brasil, grande parte dos estudos em genética voltou-se a espécie *L. vannamei*. A maior parte destes estudos utilizou diferentes marcadores moleculares, como os de microssatélites e Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), (FREITAS, 1999; FREITAS E GALETTI, 2002), o que permitiu o diagnóstico da variação genética encontrada nos diversos plantéis de reprodutores de *L. vannamei* provenientes de larviculturas do Brasil.

Uma outra iniciativa surgiu em 2003, o Shrimp Genome Project (ShEST) tendo como objetivo o seqüenciamento de milhares de Expressed Sequence Tags (EST) do camarão marinho *L. vannamei*, ainda em andamento. Apesar do grande passo dado em pesquisas com genética de camarão, o Brasil ainda não dispõe de informações sistematizadas da base genética de seus plantéis reprodutores, baseadas em técnicas moleculares reproduzíveis entre laboratórios e que possam ser utilizadas em longo prazo.

A genética é uma das ferramentas que pode colaborar para o êxito da atividade através da caracterização de linhagens específicas, do monitoramento da variabilidade genética dos plantéis, do estudo de distâncias genéticas e da elaboração de programas de cruzamentos seletivos.

3.5 Marcadores moleculares utilizados em estudos populacionais

As proteínas e isoenzimas foram os primeiros marcadores utilizados, seguidos pelo Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Variable Number Tandem Repeats (VNTR), que constituem os minissatélites e os microssatélites, e pelo Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). No entanto, esses marcadores não apresentam um

uso comum, possuindo características distintas utilizáveis em aplicações específicas (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

Sbordoni et al. (1986) fizeram um dos primeiros estudos em camarões marinhos cultivados da espécie *Marsupenaeus japonicus*, através de marcadores isoenzimáticos, o que representou um marco no uso de marcadores moleculares na carcinicultura. Apesar de um baixo grau de polimorfismo, essas análises enzimáticas foram fundamentais para o estudo da variabilidade genética em camarão.

Os estudos moleculares baseados em DNA vêm se mostrando muito mais eficientes que os genético-bioquímicos, especialmente, com relação ao polimorfismo, principalmente com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BALL et al., 1998; BENZIE, 2000; ESPINOSA et al., 2003; GARCIA et al., 1996; MEEHAN et al., 2003; XU et al., 1999, 2001; WOLFUS et al., 1997). Essa tecnologia facilitou a descrição de várias classes de marcadores moleculares com aplicações em programas de criação de camarão, incluindo identificação de populações e análise de variabilidade genética (FREITAS E GALETTI, 2002; GARCIA et al., 1996; SUNDEN E DAVIS, 1991).

Um marcador de DNA é tipicamente uma pequena região do DNA apresentando polimorfismo entre indivíduos (LIU, 1998). O termo “marcador” tem sido utilizado para designar fatores morfológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permite o estudo comparativo de genótipos.

Diferentes marcadores de DNA têm sido utilizados na análise de parâmetros genéticos populacionais, entre eles os marcadores de microssatélites que possuem todas as características desejáveis a serem utilizadas em estudos de genética de populações por apresentarem alto polimorfismo, serem co-dominantes e seletivamente neutros (POWELL et al., 1996).

Loci de microssatélites são constituídos por seqüências curtas de DNA repetitivo, de 1 a 6 pares de bases, repetidas várias vezes de maneira idêntica e adjacente (repetição em tandem). As seqüências de DNA que flanqueiam as microssatélites são conservadas, o que permite a construção de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica, denominados primers, de 20 a 30 bases, e sua amplificação pode ser feita via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O polimorfismo das seqüências de microssatélite é baseado nas diferenças de comprimento das seqüências amplificadas, pois o número de repetições em cada microssatélite é variável (LITT E LUTY, 1989; WEBER et al., 1989).

Além disto, estes marcadores são co-dominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores de microssatélites estão sendo cada vez mais utilizados em análises de estrutura populacional de várias espécies, como: bovinos (BECKMANN E SOLLER, 1990; FRIES, 1993), ovinos (CRAWFORD et al., 1994), eqüinos (MARKLUND et al., 1994), humanos (WEBER, 1990), salmão (SLETTAN et al., 1993), ostras européias (NACIRI et al., 1995) e na maior parte das espécies de peneídeos de importância comercial (CRUZ et al., 2004; VALLES-JIMENEZ et al., 2005; WOLFUS et al., 1997).

4. ARTIGO CIENTÍFICO**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE DUAS LARVICULTURAS DE CAMARÃO MARINHO
Litopenaeus vannamei DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

Artigo a ser submetido para o Journal of the World Aquaculture Society

**LIMA, A. P. S.¹; SANTOS, A. C. L.¹; SILVA, S. M. B. C.¹; MAGGIONI, R.^{2,3};
COIMBRA, M. R. M.^{1*}**

¹ Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil; Laboratório de Genética Aplicada – LAGA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

² Núcleo de Genômica e Bioinformática – NUGEN, Universidade Estadual do Ceará, Brasil

³ Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central – FECLESC, Universidade Estadual do Ceará, Brasil

*Autor para correspondência:

Maria Raquel Moura Coimbra, Laboratório de Genética Aplicada – LAGA,
Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos Recife-PE, Brasil, CEP 52171-900,

Tel: 81-33206522, email: raquel@depaq.ufrpe.br.

Resumo

Nos últimos anos a aqüicultura cresceu rapidamente no Brasil, particularmente na produção de camarões marinhos, tendo a espécie exótica *Litopenaeus vannamei*, como a principal espécie cultivada. Em 1997 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) proibiu a introdução de novos reprodutores, pela Portaria de nº. 119, desde então, a formação de novos plantéis de *L. vannamei* passou a ser baseada de animais provenientes de centros de reprodutores nacionais. Baixos níveis de variabilidade genética podem afetar negativamente na produtividade através do aumento da susceptibilidade às doenças e reduzidas taxas de crescimento. A detecção da variabilidade genética pode ser analisada por diferentes técnicas de biologia molecular, utilizando marcadores moleculares de microssatélites. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar geneticamente duas larviculturas de *Litopenaeus vannamei* do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. A caracterização genética foi feita usando 5 loci de microssatélites e um total de 100 amostras teciduais de reprodutores, para as duas larviculturas. Foi evidenciado que há variabilidade genética suficiente para subsidiar programas de melhoramento genético, baseado na frequência dos alelos, nos coeficientes de endogamia F_{IS} (Larv. A = 0,380 e Larv. B = 0,250) e heterozigosidades que variaram de $H_o = 0,190$ a $0,810$ e $H_e = 0,460$ a $0,870$, respectivamente. A diferenciação entre as larviculturas, F_{ST} (0.0215), indicou uma pequena diferenciação genética e que a maior parte da diferença entre as populações se deve a variações intrapopulacionais, o que foi confirmado pela análise de variância molecular (AMOVA). Os resultados aqui relatados podem ser considerados bons, refletindo a história da atividade no Brasil que se destacou pela introdução de reprodutores de diversas origens.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, SSR, STR , Variabilidade Genética, Consangüinidade,

1. Introdução

O crescimento da aqüicultura notabilizou-se no Brasil, particularmente na produção de camarões marinhos, tendo a espécie exótica *Litopenaeus vannamei*, como a principal espécie cultivada. De acordo com os dados da Food and Agricultural Organization (FAO), a carcinicultura gerou para o ano de 2003, um total 1.278.363 toneladas para o país, das quais 40,66% foram oriundas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2005).

A carcinicultura cresceu rapidamente e atualmente responde por 99% das exportações de camarão do Brasil. Entretanto, o ano de 2004 foi marcado por uma crise no setor, quando a produção de camarão sofreu uma queda de 15.84%, em função de questões comerciais internacionais, tais como a aplicação de sobretaxas na exportação do camarão brasileiro, a chamada ação “anti-dumping” movida por agências de pesca dos EUA; o incremento da produção de *L. vannamei* na Ásia; o câmbio desfavorável à importação e os surtos virais da Mionecroe infecciosa (MADRID, 2005).

O aumento da susceptibilidade às doenças e reduzidas taxas de crescimento podem refletir baixos níveis de variabilidade genética para estas características (WOLFUS et al., 1997). Assim, camarões resistentes a patógenos e com melhores taxas de crescimento que garantam alta produtividade são metas indispensáveis para contrabalançar os baixos preços do mercado.

Animais de cultivo geralmente apresentam baixos níveis de variabilidade genética, diferentemente das populações naturais onde normalmente esse valor é alto (NEI, 1978; SOLÈ-CAVA, 2001). A variabilidade genética é o atributo mais importante em uma população e constitui o material sobre o qual a seleção atua. Uma população com alta variabilidade terá maiores possibilidades de responder aos

programas de melhoramento e enfrentar com sucesso as adversidades do ambiente (SOTO-HERNÁNDEZ E GRIJALVA-CHON, 2004).

A maior parte da produção brasileira de pescado oriundo da aquicultura é constituída por espécies exóticas. Tendo em vista o risco de estas espécies constituírem vetores de organismos patogênicos, a introdução de novos reprodutores, inclusive de crustáceos foi proibida pelo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Portaria de nº. 119, de 17 de outubro de 1997. A partir desta data, a formação de novos plantéis de camarão passou a ser composta de reprodutores domesticados, o que levanta questões sobre a existência de variabilidade genética que viabilize programas de melhoramento no Brasil.

A variabilidade genética em populações vem sendo analisada mediante a utilização de técnicas de biologia molecular, que usam marcadores moleculares. Dentre estes se destacam os de microssatélites, que apresentam comportamento co-dominante, são altamente polimórficos e seletivamente neutros, podendo ser utilizados em estudos que abordam desde análises de estrutura genético-populacional até estudos de paternidade (SCHLÖTTERER, 2000).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente, em termos de variabilidade e níveis de consangüinidade, duas larviculturas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no estado de Pernambuco, através de microssatélites.

2. Material e métodos

2.1 Coleta das amostras

Amostras teciduais de reprodutores foram coletadas em dois laboratórios produtores de pós-larva de *L. vannamei*, A (N= 50, 25♂ e 25♀) e B (N= 50, 25♂ e 25♀), localizados no Estado de Pernambuco, Brasil, durante janeiro de 2006. A fim de que a sobrevivência dos reprodutores não fosse comprometida, o 5º par de pleópodos foi retirado, sendo imediatamente armazenado em etanol a 95%, procedimento padrão para a preservação do DNA genômico em amostras de tecido animal (SAMBROOK et al., 1989).

2.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo padrão de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (FCI), com algumas modificações (SAMBROOK et al., 1989). Para cada amostra eram usados 700µL de tampão de extração (Tris-HCl 100mM pH 7.5, 1% SDS) e 30µL de proteinase K (10µg/ml). A mistura foi incubada a 50°C por 2 horas e depois a 37°C “overnight”. Em seguida, o DNA foi purificado sucessivamente com FCI (25:24:1), clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a cada etapa a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e o DNA total foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Para a remoção final do excesso de sal e etanol o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e brevemente centrifugado (10.000 g por 5 min). O DNA foi re-suspendido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) e armazenado em freezer a -20°C.

2.3 Amplificação dos loci de microssatélites por PCR

Cinco pares de primers descritos na literatura foram selecionados com base na definição dos amplicons e reprodutibilidade (Tabela 1). As reações de PCR foram conduzidas utilizando-se as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 min; 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 50°C por 45s, extensão a 72° C por 1 min e extensão final a 72° por 10 min. Cada reação continha 1U de *Taq* polimerase, 200µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 1µM de cada primer e 100ng de DNA para um volume final de 10 µL..

Tabela 1. Repetições, *primers Forward e reverse* e tamanho esperado (pb) para os cinco loci de microssatélites analisados.

Locus de Microssatélite	Repetições	Primers <i>Forward e Reverse</i> (5'→3')	Tamanho esperado(pb)	Referência bibliográfica
TUMXLv8.2	...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AC) ₃ ...(AT) ₃	F: CCTCCTGTCCATTCAGCAG R:GGTCAGATATGTATTTCGAGTRCGG	244	MEEHAN et al., (2003)
TUMXLv5.27	...(TC) ₄ ...(CT) ₄ ...(TC) ₃ ...(CT) ₃ ...(TC) ₅ ...	F: CAGACCCTAAATCTCCGTGC R: TGGAAGGTCAGAGGTCACG	175	MEEHAN et al., (2003)
TUMXLv5.38	(TC) ₈ ... ^{...} (CT) ₄ ...(TC) ₄ ...	F: CCTTTATGACTTCCCCCGAC R: CCGTACAGAAACGGAACGTC	215	MEEHAN et al., (2003)
TUMXLv8.32	...(CA) ₃ ...(TA) ₄ ...	F:TTACCGCCTAAGAGCGAATG R:TGTCCTTTCGTACCAGTCAAG	220	MEEHAN et al., (2003)
Pvan0013	(TA) ₅ ... (AT) ₄	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	282-284	CRUZ et al., (2002)

2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida vertical a 4% ou 5%, dependendo do tamanho do fragmento

esperado. A eletroforese durou em média 1 hora e 30 min a 2000 V, 60MA e 55W. Ao término da corrida, o gel de poliacrilamida foi fixado com ácido acético 10%, seguido de coloração com nitrato de prata a 0,1% e revelado com carbonato de sódio. O registro da imagem foi feito em um scanner .

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa computacional GENEPOP (RAYMOND E ROUSSET, 1995), onde parâmetros tais como número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), os índices de fixação de Wright, diferenciação genética por locus e o desequilíbrio de ligação e foram calculados. A significância dos testes múltiplos foi corrigida pelo método de Bonferroni (RICE, 1989). O índice de fixação F_{IS} é o coeficiente de endogamia de um grupo de indivíduos em relação à subpopulação que eles pertencem, já o F_{ST} permite caracterizar a distribuição da variabilidade genética entre populações por ser um índice que descreve a variação existente nas freqüências alélicas entre populações (BEAUMONT et al., 2003).

O número de alelos efetivos (a_e) foi calculado através da seguinte fórmula:

$a_e = 1/\sum x_i^2$, onde o x_i é a freqüência de cada alelo por locus (CROW E KIMURA, 1970).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos, sendo calculado de acordo com Botstein et al., (1980), com a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2, \text{ Onde:}$$

K = número de alelos; X_i = frequência relativa do alelo i na amostra; X_j = frequência relativa do alelo j na amostra.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi estimada com o programa computacional Arlequin 2.000 (SCHNEIDER et al., 2000) baseado em 1000 permutações.

3 Resultados

3.1 Análise da diversidade genética

A variabilidade genética das larviculturas do *L. vannamei* para os cinco loci de microssatélites está descrita na Tabela 2. O número de alelos variou de 3 a 12, o número de alelos efetivos (a_e) variou de 1,64 a 7,69, e a heterozigosidade observada (H_o), de 0,140 a 0,840. Os loci que apresentaram o maior número de alelos foram o TUMXLv 5.38 e o TUMXLv 5.27.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) dentro das larviculturas variou de 0,36 a 0,85 (Tabela 2). Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

As probabilidades encontradas nas análises do desequilíbrio de ligação, quando corrigidas pelo método de Bonferroni, não foram significativas, indicando que não há associação entre os loci, ou seja, que cada locus avaliado situa-se provavelmente em um cromossomo diferente do *L. vannamei*.

A distribuição da frequência e o tamanho dos alelos para os 5 loci de microssatélites estão representados na figura 1. Um único locus, TUMXLv 8.2, apresentou os mesmos alelos para as duas larviculturas. O restante dos loci compartilhou a maior parte dos alelos nas duas larviculturas, mas também apresentou alelos únicos para cada uma delas. Os alelos de maior frequência foram para o locus TUMXLv 5.27 o de 174 pb, de 176 pb e de 178 pb, já para o locus TUMXLv 5.38 foram os de 204 pb, 208 pb e 210 pb, para o locus TUMXLv 8.2 foram os de 230 pb e 248 pb, para o locus TUMXLv 8.32 foram os alelos 220 pb, 222 pb e 224 pb e finalmente para o locus Pvan0013, o alelo 282 pb foi o de maior frequência.

3.2 Estatísticas F de Wright e AMOVA

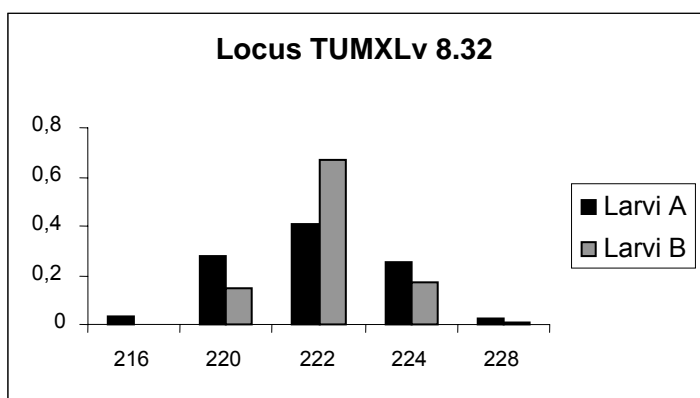
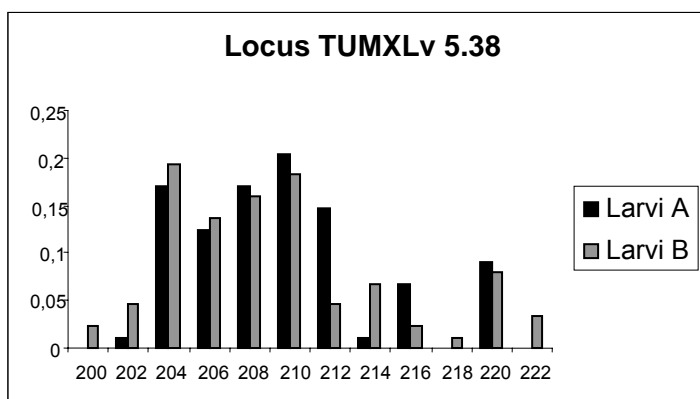
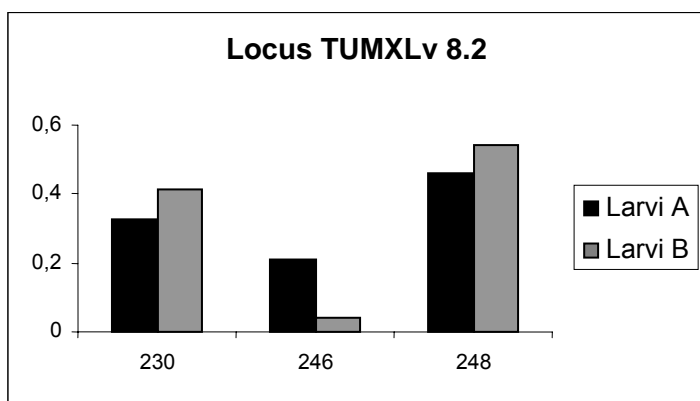
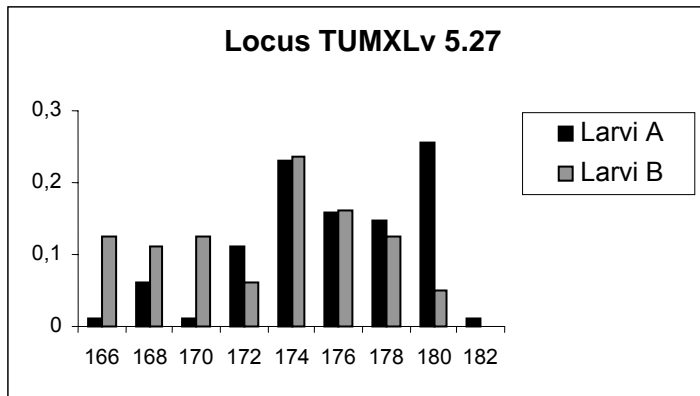
Os valores médios encontrados para o F_{IS} foram de 0,380 para a larvicultura A e 0,250 para a larvicultura B. Os valores F_{IS} indicam uma redução na proporção média de genótipos heterozigotos (Tabela 3).

O valor do F_{ST} total foi de 0.0215 indicando uma pequena diferenciação genética (Tabela 3) e que a maior parte da diferença entre as populações se deve a variações intrapopulacionais. Este fato pôde ser confirmado pela análise de variância molecular (AMOVA), onde a variação entre as larviculturas foi de 0,0215, enquanto que entre indivíduos dentro das larviculturas foi de 0,280 e, entre indivíduos foi de 0,700. A diferenciação genética por locus, mostrou que há diferença significativa entre as larviculturas para os loci TUMXLv 5.38 e Pvan 0013 (Tabela 4).

Tabela 2. Variabilidade genética das populações de *Litopenaeus vannamei* de duas larviculturas para cinco loci

População	Locus					MÉDIA
	TUMXLv 5.27	TUMXLv5.38	TUMXLv 8.2	TUMXLv8.32	Pvan 0013	
Larvicultura A						
Nº de indivíduos	41	44	40	43	37	41
A	9	9	3	5	4	6
a_e	5,56	6,67	2,70	3,23	2,04	4,04
Ho	0,680	0,770	0,230	0,400	0,240	0,460
He	0,830	0,860	0,640	0,700	0,520	0,710
PIC	0,79	0,83	0,58	0,63	0,52	0,67
Larvicultura B						
Nº de indivíduos	40	44	35	44	43	41,20
A	8	12	3	4	3	6
a_e	6,67	7,69	2,13	2	1,64	4,03
Ho	0,730	0,840	0,140	0,500	0,280	0,500
He	0,860	0,880	0,540	0,510	0,390	0,640
PIC	0,80	0,85	0,43	0,45	0,36	0,58
Total de todas as populações						
Nº de indivíduos	81	88	75	87	80	411
Média n alelos	8,5	10,5	3	4,5	3,5	6
Média Ho	0,710	0,810	0,190	0,450	0,260	0,480
Média He	0,850	0,870	0,590	0,610	0,460	0,680
Média PIC	0,80	0,84	0,51	0,54	0,44	0,63

"A indica o número de alelos; a_e , número de alelos efetivos; Ho, heterozigosidade observada; He, heterozigosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica"



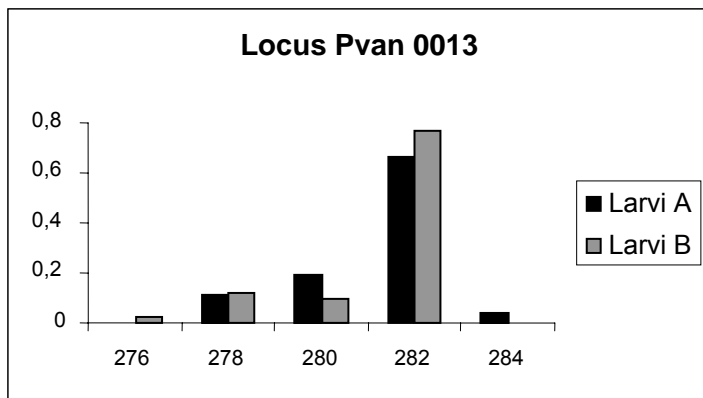


Figura 1. Histogramas das frequências dos alelos para cada locus de microssatélites do *L. vannamei*.

Tabela 3. Índices de Wright (F_{IS} e F_{ST}) para as duas larviculturas de *L. vannamei*^a

Locus	F_{IS}		F_{ST}
	Larvicultura A	Larvicultura B	
TUMXLv 5.27	0,1771	0,1607	0.0281
TUMXLv 5.38	0,1017	0,0430	-0.0006
TUMXLv 8.2	0,6532	0,7381	0.0132
TUMXLv 8.32	0,4360	0,0105	0.0608
Pvan 0013	0,5352	0,2921	0.0070
Média	0,380	0,250	0.0215

^aDados obtidos através do GENEPOP (RAYMOND E ROUSSET, 1995).

Tabela 4. Diferenciação genética das larviculturas por locus^a

População	Locus				
	TUMXLv 5.27	TUMXLv 8.2	TUMXLv 5.38	TUMXLv 8.32	Pvan 0013
Larvi.A x Larvi.B	0,00021	0,00723	0,07479	0,00399	0,06929

^aDados obtidos através do GENEPOP (RAYMOND E ROUSSET, 1995), Para todos os valores, $P > 0,05$, indica que há diferença genética significativa por locus entre as larviculturas.

4. Discussão

Alguns estudos genéticos importantes vêm sendo realizados na espécie *Litopenaeus vannamei*, tais como o estudo do genoma mitocondrial (PODSIADLOWSKI E BARTOLOMAEUS, 2005), o desenvolvimento de marcadores (CRUZ et al. 2002; MEEHAN et al., 2003) e diferenciação genética de populações naturais e cultivadas através de marcadores moleculares (VALLES-JIMENEZ et al., 2005).

Devido a grande importância econômica que esta espécie representa para o país, em especial para a região Nordeste, e diante dos surtos virais em países vizinhos ao Brasil, o IBAMA proibiu a importação de animais desta espécie em 1997 devido ao risco da introdução de patógenos. Assim, a carcinicultura nacional tem baseado sua produção a partir de plantéis reprodutivos domesticados, o que despertou a necessidade de se adotar medidas de manejo que visem não só o desempenho produtivo, mas também a sustentabilidade dos plantéis sob o ponto de vista genético. Uma vez conhecendo a base genética dos plantéis existentes, os efeitos de endocruzamento poderão ser evitados através de cruzamentos programados que minimizem a endogamia (BORLASE et al., 1993).

Estudos desenvolvidos no passado com *L. vannamei* mostraram uma variação alélica significativa para loci de microssatélites. Nas Filipinas, por exemplo, de 21 a 47 alelos foram encontrados em populações de *L. vannamei* (WOLFUS et al., 1997). Entretanto, recentemente, Valles-Jimenez et al. (2005) identificaram de 2 a 16 alelos por locus para cinco loci de microssatélites em populações naturais de *L. vannamei* do México e Panamá, valores muito similares aos encontrados no presente trabalho (de 3 a 12 alelos por locus) para 5 loci de microssatélite. Este fato

possibilita afirmar que as larviculturas de Pernambuco possuem um número de alelos compatível com o de populações naturais desta espécie.

A heterozigosidade média relatada por Valles-Jimenez et al. (2005), em populações naturais de *L. vannamei* ($H_o = 0,164$ a $0,535$; $H_e = 0,385$ a $0,857$), mostraram menor variação do que as encontradas no presente estudo ($H_o = 0,190$ a $0,810$; $H_e = 0,460$ a $0,870$). Todas as heterozigosidades médias observadas por larviculturas foram menores que as esperadas, refletindo um marcado afastamento das proporções esperadas de Hardy-Weinberg, um fato comum em cativeiro quando condições de cruzamento aleatório e tamanho populacional infinito não são atendidas.

Como estimadores de variabilidade o número e distribuição dos alelos são também importantes. Assim uma avaliação genética apropriada deve considerar tanto a heterozigosidade quanto o número e distribuição dos alelos para se obter uma estimativa fiel (BEARDMORE et al., 1997).

Os valores de PIC (0,36 a 0,85) aqui encontrados estão dentro do esperado para esse grupo de marcadores de microssatélites, podendo ser considerados de médio a muito informativos. Valores de PIC entre 0,195 e 0,871 foram descritos por Meehan et al., (2003) para dezenas de marcadores de microssatélites, incluindo quatro dos marcadores avaliados no presente trabalho.

A diferença genética encontrada entre as duas larviculturas ($F_{ST} = 0,0215$), embora estatisticamente diferente de zero, não pode ser considerada alta. Luan et al (2006) observaram valores muito próximos ($F_{ST} = 0,023$) em uma comparação entre uma população selvagem e de cultivo de *Marsupenaeus japonicus*, enquanto Soto-Hernández et al. (2004), registraram valores mais altos ($F_{ST} = 0,086$) com aloenzimas em populações selvagens e cultivadas de *L. vannamei*. A diferença genética

encontrada no presente trabalho indica que estas larviculturas tiveram acesso a um grupo de reprodutores de origem genética similar e que o manejo de seleção de matrizes é igualmente comum, ou seja, reprodutores são adquiridos de maneira aleatória de diferentes centros de engorda pelas larviculturas do nordeste. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da diferença entre as populações deve-se, todavia, a diferenças entre indivíduos, o que é esperado no caso de populações homogêneas.

Os valores médios de F_{IS} foram de 0,380 para a larvicultura A e de 0,250 para a larvicultura B, significativamente diferente de zero, indicando a perda da variabilidade genética dos plantéis. Isto se deve provavelmente à limitação física para a manutenção de grandes plantéis, a falta de introdução de novos pools gênicos e ao cruzamento entre indivíduos aparentados. Ainda assim, os valores de F_{IS} encontrados podem ser considerados moderados, tendo em vista que populações naturais do México mostraram níveis médios em torno de 0,53 (VALLES-JIMENEZ et al., 2005), e em populações de *L. vannamei* selvagens e de cultivos que mostraram níveis médios de 0,63 (SOTO-HERNÁNDEZ et al. 2004).

O nordeste se destaca na carcinicultura brasileira por concentrar a maior produção do país. A diferenciação genética entre os indivíduos nas larviculturas de Pernambuco evidencia a existência de variabilidade genética, o que se deve a formação original da base genética dos plantéis com origens múltiplas, tais como Panamá, Equador, Venezuela, Peru, Guatemala, México e Costa Rica, introduzidas até 1997 em diferentes estados. Esta situação é extremamente favorável, uma vez que mesmo com quase uma década de fronteiras fechadas, sem renovação de matrizes, foi possível conservar uma variabilidade genética que viabilize um programa de melhoramento genético visando à produção de animais resistentes a

determinados patógenos ou com menores taxas de conversão alimentar. O monitoramento continuado destes plantéis deve ser tomado como uma ferramenta importante na preservação desta variabilidade.

5. Conclusões

Os loci de microssatélites selecionados permitiram caracterizar geneticamente a estrutura genética das populações devido à definição e reprodutibilidade dos amplicons, compondo um conjunto de marcadores distribuídos de maneira aleatória no genoma do *L. vannamei*, o que viabilizará ao longo do tempo avaliação da condição genética das larviculturas.

A pequena diferenciação genética entre os dois laboratórios de maturação do estado de Pernambuco mostrou-se compatível com a história da carcinicultura brasileira, onde os estoques reprodutores foram fundados a partir de uma amostragem bastante ampla do germoplasma da espécie.

6. Referências Bibliográficas

BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C., LEWIS, R. I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research* 28:829-839, 1997.

BEAUMONT, A. R.; HOARE, K. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. ed. Blackwell Science 158 p, 2003.

BORLASE, S. C., LOEBEL, D. A., FRANKHAM, R., NURTHEN, R. K., BRISCOE, D. A., DAGGARD, G. E. Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: Consequences of equalization of family sizes. *Conservation Biology* 7:122-131, 1993.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. P., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Anim Genet* 32:314–331, 1980.

CROW, J. F. & KIMURA, M. *An introduction to population genetics theory* Harper & Row, New York, 1970.

CRUZ, P., MEJIA-RUIZ, C. H., PEREZ-ENRIQUEZ, R., IBARRA, A. M. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2(3): 239-241, 2002.

FAO. *Aquacult-PC*: Fishery information, data and statistics (FIDI), time series of production from aquaculture (quantities and values) and capture fishers (quantities).

FAO: Programa Computacional, 2005.

SOTO-HERNÁNDEZ, J., GRIJALVA-CHON, J. M. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. *Aquaculture International* 12: 593–601, 2004.

LUAN, S., KONG, J., WANG, Q. Y. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquaculture Research*, 37, 785-792, 2006.

MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e 2004, o início de uma nova fase. *Revista da ABCC*, 1: p.76-84, 2005.

MEEHAN, D., XU, Z., ZUNIGA, G., ALCIVAR-WARREN, A. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: deacapoda). *Mar. Biotechnol.* V. 5, p. 311-330, 2003.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590, 1978.

PODSIADLOWSKI, L., BARTOLOMAEUS, T. Organization of the mitochondrial genome of Mantis shrimp *Pseudosquilla ciliate* (Crustacea: Stomatopoda). *Mar. Biotechnol.* 7 (6), 618–624, 2005.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86, V. 3, p. 248-249, 1995.

RICE, W. R. Analyzing Tabbles of Statistical Tests. *Evolution* 43: 223-225, 1989

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. E., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989.

SCHOLOTTERER, C. Evolutionary Dynamics of Microsatellite DNA. *Journal Chromosoma*, 6, 365-371, 2000.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L. Arlequin ver 2.000: A Software for Population genetics data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SOLÈ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S. R. (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução* p. 172 - 192; Ed. Holos, 2001.

SOTO-HERNÁNDEZ, J., GRIJALVA-CHON, J. M. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. *Aquaculture International* 12: 593–601, 2004.

VALLES-JIMENEZ, R., CRUZ, P., PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from México to Panamá: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6:475-484, 2005.

WOLFUS, G. M., GARCIA, O. K., ALCIVAR-WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 35-47, 1997.

5. ARTIGO CIENTÍFICO**MONITORAMENTO GENÉTICO NA REPOSIÇÃO DE MATRIZES DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM PERNAMBUCO, BRASIL.**

Artigo a ser submetido para o periódico Aquaculture Research

**LIMA, A. P. S.¹; SANTOS, A. C. L.¹; SILVA, S. M. B. C.¹; SILVA, E. J.O.¹;
DANTAS, H. L.¹; MAGGIONI, R.^{2,3}; COIMBRA, M. R. M.^{1*}**

¹ Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil; Laboratório de genética Aplicada – LAGA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

² Núcleo de Genômica e Bioinformática – NUGEN, Universidade Estadual do Ceará, Brasil

³ Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central – FECLESC, Universidade Estadual do Ceará, Brasil

*Autor para correspondência:

Maria Raquel Moura Coimbra, Laboratório de genética Aplicada – LAGA,
Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos Recife-PE, Brasil, CEP 52171-900,

Tel: 81-33206522, email: raquel@depaq.ufrpe.br.

Resumo

O Brasil ocupa hoje posição de destaque no panorama da carcinicultura mundial, entretanto, não dispõe de informações sistematizadas da base genética de seus plantéis. Para a manutenção da sustentabilidade genética de uma espécie é necessário que a população disponha de diversidade genética. Em populações cultivadas, o monitoramento da variação genética é recomendado para permitir o acompanhamento de eventuais mudanças na variabilidade causadas pelo endocruzamento, deriva genética ou pela seleção. O manejo de reprodutores em cultivos de camarão pode causar redução ou eliminação da variabilidade genética. Em muitos sistemas de larvicultura de camarão, a obtenção de reprodutores é feita em sistema fechado, ou seja, as pós-larvas são levadas para fazendas de engorda específicas, onde crescem até serem selecionadas para formar um novo lote de matrizes, fechando-se o ciclo e mantendo-se a mesma origem genética. Diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados na análise de parâmetros genéticos populacionais, entre eles os marcadores de microssatélites. Objetivou-se monitorar a variabilidade genética de uma larvicultura de *L. vannamei* do estado de Pernambuco ao longo de três reposições sucessivas de matrizes em três momentos diferentes, através de marcadores de microssatélites. Pelos resultados obtidos, ficou evidenciada que a reposição intercalada de matrizes, adotada em alguns sistemas de cultivo fechado no Brasil, não vem comprometendo a variabilidade genética destas larviculturas, o que foi mostrado através das heterozigosidades médias que foram na primeira coleta de $H_o = 0,460$ e $H_e = 0,660$, na segunda coleta de $H_o = 0,420$ e $H_e = 0,620$, e na terceira coleta de $H_o = 0,600$ e $H_e = 0,660$, e dos alelos que permaneceram praticamente constantes nas três reposições. Os resultados encontrados nesse estudo provavelmente foram em função da grande diversidade do estoque fundador com múltiplas origens.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, Microssatélites, Monitoramento, Reposição de Matrizes.

1.Introdução

A carcinicultura marinha é o segmento mais bem sucedido da carcinicultura mundial, proporcionando empregos diretos e indiretos para milhões de trabalhadores e milhões em receita (ROCHA et al., 2004). O Brasil ocupa hoje posição de destaque no panorama da carcinicultura mundial, entretanto, não dispõe de informações sistematizadas da base genética de seus plantéis.

Para a manutenção da sustentabilidade genética de uma espécie é necessário que a população disponha de diversidade genética, a fim de garantir sua sobrevivência em longo prazo. Em populações cultivadas, programas de monitoramento da variação genética são recomendados para permitir o acompanhamento de eventuais mudanças na variabilidade causadas pelo endocruzamento, deriva genética ou pela seleção (ALLENDORF E RYMAN, 1987).

A perda da variabilidade genética em cultivos causada pela falta de renovação dos reprodutores do plantel e estratégias inadequadas de cruzamento foi relatada em cultivos de *Penaeus stylirostris* (BIERNE et al., 2000), *Penaeus monodon* (XU et al., 2001), e *Litopenaeus vannamei* no Equador e México (GARCIA et al., 1994; WOLFUS et al., 1997).

No Brasil, a introdução de novos reprodutores da espécie *L. vannamei* está proibida pelo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Portaria nº. 119, de 17 de outubro de 1997, devido ao risco dessas espécies serem vetores de patógenos exógenos, passando assim a serem utilizados animais provenientes de diferentes centros reprodutores de camarão nacionais para formação de novos plantéis.

O manejo de reprodutores em cultivos de camarão pode acentuar a redução ou eliminação da variabilidade genética, pois o cultivo em pequenas populações

propicia o cruzamento entre indivíduos aparentados. O endocruzamento favorece a homozigose, podendo causar depressão por endogamia, interferindo negativamente na produtividade ou até mesmo expondo à manifestação alelos deletérios (FALCONER E MACKAY, 1996; BROWN et al 1990).

Em muitos sistemas de larvicultura de camarão, a obtenção de reprodutores é feita em sistema fechado, ou seja, nestes sistemas os reprodutores são obtidos de uma única fazenda de engorda associada, sistematicamente suprida por pós-larvas de uma única larvicultura. Muito embora várias desovas sejam necessárias para povoar os diversos viveiros de uma fazenda, a origem genética destes reprodutores é uma só. Este fato desperta a questão: há ou não uma perda gradativa de variabilidade genética ao longo de sucessivas reposições de reprodutores nas larviculturas?

A identificação de marcadores genéticos estáveis, além de estimar os níveis de variação genética, pode discriminar linhagens e indivíduos, auxiliando no monitoramento de estoques cultivados e no desenvolvimento de programas de melhoramento genético (CARVALHO E PITCHER, 1995).

Diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados na análise de parâmetros genéticos populacionais, entre eles os marcadores de microssatélites, que possuem todas as características desejáveis, tais como co-dominância e multialelismo, a serem utilizadas em estudos de genética de populações (SCHLÖTTERER, 2000).

Este trabalho tem como objetivo monitorar a variabilidade genética de uma larvicultura de *L. vannamei* do estado de Pernambuco ao longo de três sucessivas reposições de matrizes , através de microssatélites.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta das amostras

No período de fevereiro a outubro de 2006, foram realizadas três coletas com intervalos aproximados de quatro meses, de acordo com a reposição das matrizes (coletas 1, 2 e 3), totalizando 150 animais, com proporções iguais de ambos os sexos. Os indivíduos foram coletados de um plantel comercial da espécie *L. vannamei* oriundos de uma larvicultura localizada no estado de Pernambuco. O 5º par de pleópodos foi retirado do animal tomando-se o cuidado para não comprometer a sobrevivência do indivíduo, e imediatamente armazenado em etanol a 95%, procedimento padrão para a preservação do DNA em amostras de tecido animal (SAMBROOK et al., 1989).

Na larvicultura era adotado um sistema de ciclo fechado, ou seja, as pós-larvas seguiam para a fazenda de engorda, associada a esta larvicultura e, após uma seleção baseada em tamanho e na ausência de lesões visíveis, retornavam, após um ano, como matrizes para a mesma larvicultura.

2.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo padrão de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (FCI), com algumas modificações (SAMBROOK et al., 1989). Para cada amostra eram usados 700µL de tampão de extração (Tris-HCl 100mM pH 7.5, 1% SDS) e 30µL de proteinase K (10µg/ml). A mistura foi incubada a 50°C por 2 horas e depois a 37°C “overnight”. Em seguida, o DNA foi purificado sucessivamente com FCI (25:24:1), clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a cada etapa a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e o DNA

total foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Para a remoção final do excesso de sal e etanol o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e brevemente centrifugado (10.000 g por 5 min). O DNA foi re-suspendido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) e armazenado em freezer a -20°C.

2.2 Amplificação do DNA com 3 loci de microssatélites via PCR

Para o monitoramento foram escolhidos 3 pares de primers, TUMXLv 5.38, TUMXLv 8.2, PVan 0013 (CRUZ et al., 2002; MEEHAN et al., 2003), com base na definição dos amplicons e reprodutibilidade.

As reações de PCR foram conduzidas utilizando as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 min; 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 50°C por 45 s, extensão a 72° C por 1 min e extensão final a 72° por 10 min. Cada reação continha 1U de *Taq* polimerase, 200µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 10µM de cada primer e 100ng de DNA para um volume final de 10 µL.

2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida vertical a 4% ou 5%, dependendo do tamanho do fragmento esperado. A eletroforese durou em média 1 hora e 30 minutos a 2000 V, 60MA e 55W. Ao término da corrida, o gel de poliacrilamida foi fixado com ácido acético a 10%, seguido de coloração com nitrato de prata a 0,1% e revelado com carbonato de sódio. O registro da imagem foi feito em um “scanner”.

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa computacional GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995), onde parâmetros, tais como número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), coeficiente de endogamia, F_{IS} , e o desequilíbrio de ligação, corrigido pelo método de Bonferroni (RICE, 1989), foram calculados. O número de alelos efetivos (a_e) foi calculado através da seguinte fórmula: $a_e = 1/\sum x_i^2$, onde o x_i é a frequência de cada alelo por locus (CROW E KIMURA, 1970).

3 Resultados

A variabilidade genética das populações monitoradas de *L. vannamei* para os 3 loci de microssatélites está descrita na tabela 1. O valor médio da heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,420 a 0,600 e da heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,620 a 0,660.

Em relação ao número médio de alelos (A) em cada coleta, houve uma variação de 4,33 a 5 e o número médio de alelos efetivos (a_e) variou de 3,29 a 3,79.

Para o locus TUMXLv 5.38, os alelos mais comuns (204 pb, 206 pb, 208 pb, 210 pb, 212 pb e 214 pb) estavam presentes nas três coletas (Figura 1). Os alelos de maior frequência para o locus TUMXLv 8.2 foram os alelos 230 pb, 246 pb e 248 pb nas três coletas, sendo o alelo 248 pb o de maior frequência nas duas primeiras coletas e o alelo 230 pb, na coleta 3. Quanto ao locus Pvan 0013, os alelos 278 pb, 280 pb e 282 pb eram os mais comuns e presentes em todas as coletas e o alelo 276 pb esteve presente apenas nas coletas 1 e 3 (Figura 1).

Os valores médios de F_{IS} encontrados foram de 0,37 para a coleta 1, 0,39 para a coleta 2 e 0,13 para a coleta 3, havendo uma diferença irrelevante entre a primeira e a segunda coleta, mas uma diminuição significativa entre a segunda e a terceira coleta.

As probabilidades encontradas nas análises do desequilíbrio de ligação, quando corrigidas pelo método de Bonferroni, não foram significativas, indicando que não há associação entre os loci, ou seja, que cada locus avaliado provavelmente situa-se em um cromossomo diferente do *L. vannamei*.

Tabela 1. Variabilidade genética das populações monitoradas de *Litopenaeus vannamei* para 3 loci de microssatélites

Locus	População		
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
TUMXLv 5.38			
Nº de indivíduos	38	36	34
A	8	8	6
a_e	5,38	7,14	5
Ho	0,970	0,830	0,880
He	0,840	0,870	0,810
TUMXLv 8.2			
Nº de indivíduos	38	40	41
A	3	3	3
a_e	2,33	2,63	2,70
Ho	0,180	0,280	0,610
He	0,570	0,630	0,640
Pvan 0013			
Nº de indivíduos	38	43	39
A	4	3	4
a_e	2,27	1,59	2,17
Ho	0,240	0,160	0,310
He	0,560	0,370	0,540
Média			
Indivíduos	38	39,67	38
A	5	4,67	4,33
a_e	3,33	3,79	3,29
Ho	0,460	0,420	0,600
He	0,660	0,620	0,660

"A indica o número de alelos; a_e , número de alelos efetivos; Ho, heterozigiosidade observada; He, heterozigiosidade esperada."

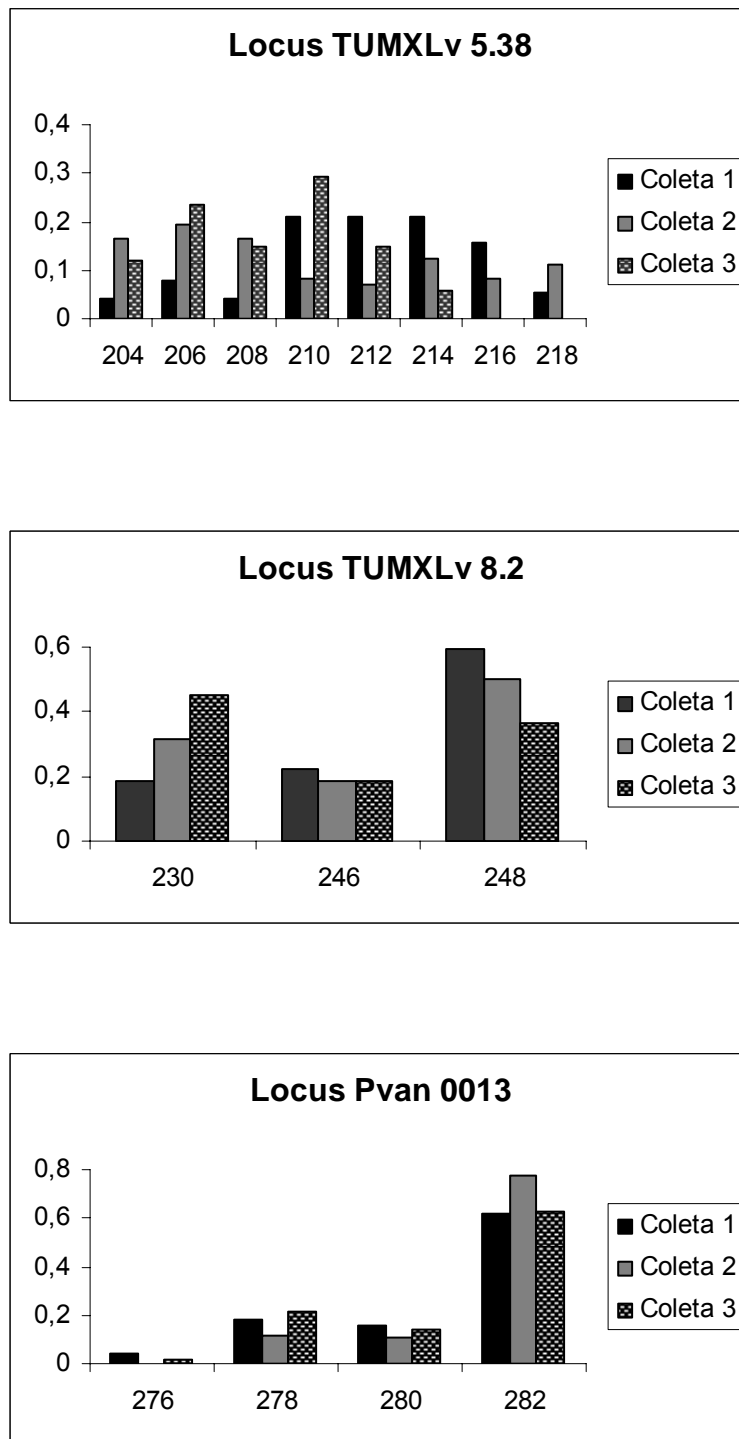


Figura 1 Histogramas das frequências dos alelos para cada locus de microssatélites do *L.vannamei*.

4. Discussão

No Brasil, programas de melhoramento para o *L. vannamei* ainda são incipientes, contudo uma grande preocupação se instalou nas larviculturas de camarão com respeito à provável perda da variabilidade, devido a não-renovação de matrizes, como consequência da Portaria que proibiu importação de crustáceos. Esta perda não pode ser avaliada de maneira direta e necessita recorrer à perda decorrente da reposição de matrizes em sistemas fechados. Em tais sistemas, as pós-larvas são levadas para fazendas de engorda específicas, onde crescem por um ano, até serem selecionadas para formar um novo lote de matrizes, voltando para a larvicultura, fechando-se o ciclo e mantendo-se a mesma origem genética.

Um dos parâmetros básicos e relevantes em estudos de estrutura populacional é a heterozigidade. Quanto mais heterozigota for uma população, maior será sua capacidade em lidar com parâmetros ambientais variáveis (BEAUMONT E HOARE, 2002). Em sistemas de aquicultura espera-se que a heterozigidade seja menor do que em populações naturais, uma vez que os acasalamentos em cativeiro não acontecem aleatoriamente.

Tamayo (2006), utilizando 4 loci de microssatélites, comparou dois estoques de parentais (G_0) e suas respectivas progênies (F_1) de populações cultivadas de *L. vannamei*, onde uma redução da heterozigidade foi detectada. Este autor encontrou uma heterozigidade observada (H_o) para um dos estoques parentais de 0,400 e $H_e = 0,600$ e para sua progênie, $H_o = 0,290$ e $H_e = 0,440$, enquanto que para o segundo estoque parental $H_o = 0,628$ e $H_e = 0,663$ e para sua progênie $H_o = 0,547$ e $H_e = 0,622$.

Cruz et al. (2004) mostraram em um estudo de famílias cultivadas de *L. vannamei* por três gerações, de G_0 a G_2 , que a heterozigidade observada (H_o) e

esperada (H_e) da geração G_0 foi de 0,650 e 0,770, para a geração G_1 foi $H_o = 0,710$ e $H_e = 0,720$ e para a G_2 , foi $H_o = 0,720$ e $H_e = 0,710$, respectivamente, revelando um aumento gradativo dos valores em função da introdução de novos reprodutores masculinos da linhagem fundadora na geração G_1 .

Na Itália, um estudo desenvolvido com *Penaeus japonicus* da geração F_1 a F_6 mostrou uma diminuição da heterozigosidade média de 0,102 a 0,039, através de aloenzimas (SBORDONI et al, 1986). No entanto, estes autores verificaram que boa parte desta perda se deveu ao efeito de bottleneck entre a F_1 e a F_2 , onde apenas 4 reprodutores da F_1 foram utilizados para produzir a F_2 . A partir da F_2 até a F_6 , os valores de heterozigosidade permaneceram relativamente constantes.

No presente estudo, as heterozigosidades observadas e esperadas para as 3 coletas ao longo de um ano, não sofreram alterações relevantes. A H_o variou de 0,420 a 0,600, enquanto que a H_e oscilou entre 0,620 a 0,660. Este aumento da heterozigosidade observada pode refletir o efeito aleatório das amostragens ou ainda diferenças no tamanho efetivo populacional dos reprodutores utilizados para produzir os indivíduos coletados nas três amostragens. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) é um parâmetro que descreve o déficit de heterozigotos em uma população e, portanto, reflete os efeitos das alterações na heterozigosidade. Os valores de F_{IS} podem variar de 0 a 1, onde 1 é o valor máximo de endogamia que pode ser encontrado em uma população. Os valores médios encontrados para o F_{IS} revelaram uma diminuição entre a segunda e a terceira coleta, de 0,39 para 0,13, refletindo os efeitos das alterações na heterozigosidade.

Valores de F_{IS} diferindo de 0 evidenciam o endocruzamento e, conseqüentemente, perda na variabilidade genética. No entanto, o valor encontrado

em populações naturais do México por Valles-Jimenez et al (2005) para *L. vannamei*, foi muito superior ($F_{IS} = 0.53$) ao aqui descrito. Tamayo (2006) encontrou valores próximos aos aqui apresentados, contudo uma das gerações consecutivas mostrou um aumento do F_{IS} (de 0,08 para 0,14).

Além da heterozogisidade um outro estimador de variabilidade genética, que deve ser considerado é o número de alelos presentes na amostra (BEARDMORE et al., 1997). A diversidade alélica também é uma medida útil de variabilidade genética dentro de uma população, desde que, as comparações sejam feitas com amostras similares.

Dentro das três coletas o número de alelos por locus variou de 3 a 8, estando próximo aos encontrados por Cruz et al. (2004), de 1 a 9 alelos, em análises de gerações consecutivas (G_0 a G_2) de *L. vannamei*. Meehan et al (2003) caracterizou dois dos locus (TUMXLv 5.38 e TUMXLv 8.2), aqui avaliados em populações SPF cultivadas de *L. vannamei* e encontrou 8 e 9 alelos, respectivamente. Os nossos dados revelaram um número máximo de alelos de 8 e 3 para estes dois loci, indicando uma redução no locus TUMXLv 8.2, possivelmente devida à deriva genética no momento inicial da importação da espécie para o Brasil.

O locus Pvan 0013 foi caracterizado por Cruz et al.(2002), que verificaram apenas 2 alelos em populações cultivadas de *L. vannamei*. Valles-Jimenez et al. (2005) observaram em populações naturais de *L. vannamei* para o locus Pvan 0013 um número máximo de 6 alelos. É interessante ressaltar que dos 6 alelos encontrados por aqueles autores, 3 estiveram presentes nas nossas amostras (de um total de 4 alelos), sendo o alelo 282 pb o de maior frequência nos dois estudos.

Com a falta de renovação dos plantéis brasileiros e com o sistema de ciclo fechado adotado por algumas larviculturas, era de se esperar uma tendência de

perda da variabilidade genética, o que não foi evidenciado nesse estudo. Muito embora a estratégia de coletas aqui adotada não reflita diretamente gerações consecutivas, ela retrata intervalos de gerações intercalados, cuja origem genética é a mesma e que descreve uma situação transcorrida na maior parte das larviculturas que possuem fazendas de engorda associadas. Com os resultados aqui obtidos, percebe-se claramente que o número de reprodutores utilizados até o momento neste tipo de estratégia, não comprometeu a variabilidade genética ao longo de um ano.

5. Conclusão

A reposição intercalada de matrizes, em um laboratório de maturação de Pernambuco, não levou a perda significativa de variabilidade genética, provavelmente em consequência da origem múltipla do estoque fundador.

6. Referências Bibliográficas

ALLENDORF, F. W., RYMAN, N. Genetic management of hatchery stocks. In: Population Genetics and Fishery Management, Ryman, N., Utter, F. (Eds). Seattle: University of Washington Press, pp 141-159, 1987.

BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C., LEWIS, R. I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research* 28:829-839, 1997.

BEAUMONT, A. R., HOARE, k. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. *Lingue : ANGLAIS* 304p, Date de parution: 12-2002.

BIERNE, N.; BEUZART, I.; VONAU, V.; BONHOMME, F.; BEDIER, E. Microsatellite associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184, pp.202-219, 2000.

BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. 1 ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 449 p, 1990.

CARVALHO, G. R., PITCHER, T. J. Molecular genetics in fisheries. London; New York: Chapman & Hall, 1995.

CROW, J. F. & KIMURA, M. An introduction to population genetics theory Harper & Row, New York, 1970.

CRUZ, P., MEJIA-RUIZ C. H., PEREZ-ENRIQUEZ, R., IBARRA, A. M., ANDGAFFNEY, P. M. Genetic variability assessed by microsatellite in a breeding

program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* 6:157-164, 2004.

CRUZ, P., MEJIA-RUIZ, C. H., PEREZ-ENRIQUEZ, R., IBARRA, A. M. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2(3): 239-241, 2002.

FALCONER, D. S.; MACKAL, T. F. C. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4 ed. England: Longman, 464p, 1996.

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

MEEHAN, D., XU, Z., ZUNIGA, G., ALCIVAR-WARREN, A. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: deacapoda). *Mar. Biotechnol.* V. 5, p. 311-330, 2003.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86, V. 3, p. 248-249, 1995.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J., AMORIM, L. A carcinicultura brasileira em 2003. *Revista da ABCC* 1: p 30-36, 2004.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. E., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989.

SBORDONI et al, 1986 SBORDONI, V., DE METTHAEIS, M., COBOLLI SBORDONI, M., LA ROSA, G., MATTOCCIA, M. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture* 57: 239-251, 1986.

SCHOLOTTERER, C. Evolutionary Dynamics of Microsatellite DNA. *Journal Chromosoma*, 6, 365-371, 2000.

TAMAYO, R. J. M. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bone, 1931) introduced to Cuba. Master thesis - International Fisheries Management Department of Aquatic Biosciences, Norwegian College of Fishery Science - University of Tromsø, Norway, May 2006.

VALLES-JIMENEZ, R., CRUZ, P., PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from México to Panamá: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6:475-484, 2005.

WOLFUS, G. M., GARCIA, O. K., ALCIVAR-WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 35-47, 1997.

XU, Z., PRIMAVERA, J. H., DE LA PENA, L. D., PETTIT, P., BELAK, J., ALCÍVAR-WARREN, A. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199: 13-40, 2001.

6. 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. *Genetics Selection Evolution* 30:275-288, 1998.

ALLENDORF, F. W., RYMAN, N. Genetic management of hatchery stocks. In: *Population Genetics and Fishery Management*, Ryman, N., Utter, F. (Eds). Seattle: University of Washington Press, pp 141-159, 1987.

ARGUE, B. J.; ARCE, M. A.; LOTZ, J. M.; MOSS, S. M. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204, pp. 447–460, 2002.

BAKOS, J. Crossbreeding Hungarian races of common carp to develop more productive hybrids. In: Pillay, T.V.R., Dill, W. (Eds.), *Advances in Aquaculture*. Fishing News Books, Farnham, Surrey, UK, pp. 633–635, 1979.

BALL, A. O., LEONARD, S., CHAPMAN, R. W. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology* 7:1247-1263, 1998.

BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C., LEWIS, R. I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research* 28:829-839, 1997.

BEAUMONT, A. R.; HOARE, K. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. ed. Blackwell Science 158 p, 2003.

BEAUMONT, A. R., HOARE, k. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Langue : ANGLAIS 304p, Date de parution: 12-2002.

BECKMANN, J. S., SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* 8:, 1990.

BENZIE, J. A. H. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31:95-119, 2000.

BIERNE, N.; BEUZART, I.; VONAU, V.; BONHOMME, F.; BEDIER, E. Microsatelite associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirotris*. *Aquaculture* 184, pp.202-219, 2000.

BORLASE, S. C., LOEBEL, D. A., FRANKHAM, R., NURTHEN, R. K., BRISCOE, D. A., DAGGARD, G. E. Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: Consequences of equalization of family sizes. *Conservation Biology* 7:122-131, 1993.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. P., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Anim Genet* 32:314–331, 1980.

BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. 1 ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 449 p, 1990.

CARVALHO, G. R., PITCHER, T. J. *Molecular genetics in fisheries*. London; New York: Chapman & Hall, 1995.

CHIOU, T. T., WU, J. L., CHEN, T. T., LU, J. K. Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidin-like antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol.* 7 (2), 119–127, 2005.

CRAWFORD, A. M., MONTGOMERY, G. W., PIERSON, C. A., BROWN, T., DODDS, K. G., SUNDEN, S. L. F., HENRY, H. M., EDE, A. J., SWARBRICK, P. A., BERRYMAN, T., PENTY, J. M., HILL, D. F. Sheep linkage mapping: nineteen linkage groups derived from the analysis of paternal half-sib families. *Genetics*, 137: 573-579, 1994.

CROW, J. F. & KIMURA, M. An introduction to population genetics theory Harper & Row, New York, 1970.

CRUZ, P., MEJIA-RUIZ C. H., PEREZ-ENRIQUEZ, R., IBARRA, A. M., ANDGAFFNEY, P. M. Genetic variability assessed by microsatellite in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology* 6:157-164, 2004.

CRUZ, P., MEJIA-RUIZ, C. H., PEREZ-ENRIQUEZ, R., IBARRA, A. M. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Molecular Ecology Notes* 2(3): 239-241, 2002.

CURRAN, J. L. Human linkage mapping. Livro: *Genome mapping: A practical approach*. Editado por: Raul H. Dear. Capítulo 1, p 1-25, 1997.

EKNATH, A. E., TAYAMEN, M. M., PALADA DE VERA, M. S., DANTING, J. C., REYES, R. A., DIONISSIO, E. E., CAPILI, J. B., BOLIVAR, H. L., ABELLA, T. A., CIRCA, A. V., BENSTEN, H. B., GJERDE, B., GJEDREM, T. AND PULLIN, R. S. V.

Genetic improvement of farmed Tilapias: the performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture* 111, pp. 171–188, 1993.

ESPINOSA, G., DIAZ, R., MATOS, J., BECQUER, U., ROMO, J., BORRELL, Y. Variación aloenzimática em poblaciones cubanas del camarón blanco *L. schmitti*. *Revista de Investigaciones Marinas* 24:11-19, 2003.

FALCONER, D. S.; MACKAL, T. F. C. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4 ed. England: Longman, 464p, 1996.

FAO. *Aquacult-PC*: Fishery information, data and statistics (FIDI), time series of production from aquaculture (quantities and values) and capture fishers (quantities). FAO: Programa Computacional, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. EMBRAPA- CENARGEN, Brasília 220p.,1998.

FREITAS, P. D., GALETTI, P. M. JR. A genética de camarão no Brasil. *Revista da ABCC* 1:30-32, 1999.

FREITAS, P. D., GALETTI, P. M. JR. PCR-based VNTR core sequence analysis inferring genetic diversity in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetics and Molecular Biology* 25:431-434, 2002.

FRIARS, G. W. *Breeding Atlantic Salmon: A primer*. Atlantic Salmon Federation, St Andrews, NB, Canada, 13 pp. 1993.

FRIES, R. Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Anim. Genet.*, 24:111-116. 1993.

GARCIA, D. K., DHAR, A. K., ALCIVAR-WARREN, A. A. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 71-83, 1996.

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

GJEDREM, T., FIMLAND, E., 1995. Potential benefits from high health and genetically improved shrimp stocks. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming Swimming Through Troubled Water, Aquaculture, February 1–4, San Diego, CA, USA, 253 pp.* 1995.

GJEDREM, T. Breeding plans for rainbow trout. *Aquaculture* 100, pp. 73–92, 1992.

GOYARD, E.; PENET, L.; CHIM, L.; CUZON, G.; BUREAU, D.; BEDIER, E. Selective breeding of the Tahitian domesticated population of Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*): perspectives for the New Caledonian shrimp industry. *World Aquaculture* 33, pp. 28–30, 2002.

HETZEL, D. J. S; CROCOS, P. J.; DAVIS, G. P.; MOORE, S. S.; PRESTON, N. C. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 181: 215-223, 2000.

HUDINAGA, M. Reproduction, Development and Rearing of *Penaeus japonicus* Bate. Jap. J. 10: 305-303, 1942.

JARASRASSAMEE, B., SUPUNGUL, P., PANYIM, S., KLINBUNGA, S., RIMPHANICHAYAKIT, V., TASSANAKAJON, A. Recombinant expression and characterization of five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Mar. Biotechnol. 7 (1), 46–52, 2005.

JONES, A. G., AVISE, J. C. Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. Molecular Ecology. 6:203-213, 1997.

KINGHORN, B. P. A Review of quantitative genetics in fish breeding. Aquaculture 31, 283-304, 1983.

LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C. R. Infectious Myonecrosis (IMN): current status report on the biology of the etiological agent and development of diagnostic methods. In: FEIRA NACIONAL DO CAMARÃO, Rio Grande do Norte. Anais. p.22, 2004.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. American Journal of Human Genetics, V.44, p. 398-401, 1989.

LIU, F., LIU, Y., LI, F., DONG, B., XIANG, J. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Mar. Biotechnol. 7 (6), 600–608, 2005.

LIU, B. H. Statistical genomics linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton CRC Press. Boca Raton. 156p, 1998.

LUAN, S., KONG, J., WANG, Q. Y. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquaculture Research*, 37, 785-792, 2006.

MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e 2004, o início de uma nova fase. *Revista da ABCC*, 1: p.76-84, 2005.

MAGGIONI, R., ROGES, A. D., MACLEAN, N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes* 12: 3213-3217, 2003.

MARKLUND, S., ELLEGREN, H., ERIKSSON, S., SANDBERG, K., ANDERSSON, L. Parentage testing and linking analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.*, 25: 19-23, 1994.

MEEHAN, D., XU, Z., ZUNIGA, G., ALCIVAR-WARREN, A. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: deacapoda). *Mar. Biotechnol.* V. 5, p. 311-330, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado: seguimento de mercado. Departamento de Pesca e Aqüicultura. – Brasília : MAPA/SARC/DPA, CNPq. ABCC, 2001.

NACIRI, Y., VIGOUROUX, Y., DALLAS, J., DESMARAIS, E., DELSERT, C., BONHOMME, F. Identification and inheritance of (GA/TC), and (AC/GT), repeats in the european flat oyster *Ostrea edulis* CL.). Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 4: 83-89, 1995.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583-590, 1978.

PAREDES, L. E. Carcinicultura Marinha - o Vírus da mancha Branca no Brasil. Revista da ABCC 7: p. 30, 2005.

PINHEIRO, A. C. A. S., LIMA, A. P. S., SOUZA, M. E., NETO, E. C. L., ADRIÃO, M., GONÇALVES, V. S. P., COIMBRA, M. R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). Aquaculture 262, 17-22, 2007.

PODSIADLOWSKI, L., BARTOLOMAEUS, T. Organization of the mitochondrial genome of Mantis shrimp *Pseudosquilla ciliate* (Crustacea: Stomatopoda). Mar. Biotechnol. 7 (6), 618–624, 2005.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends of Plant Science, V.1, p. 215-222, 1996.

PULLIN, R. S. V., WILLIAMS, M. J. AND PRESTON, N. Domestication of crustaceans. Asian Fish. Sci. 11, pp. 71–80, 1998.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86, V. 3, p. 248-249, 1995.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43: 223-225, 1989

ROCHA, I. P. Uma análise da produção de demanda e preços do camarão no mercado internacional. *Revista da ABCC*, 7: p 24-35 , 2005

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J., AMORIM, L. A carcinicultura brasileira em 2003. *Revista da ABCC* 1: p 30-36, 2004.

ROCHA, I. P. Evolução e estado atual da carcinicultura brasileira. *Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aquicultura. 276p. Cap.IV.p.177-196, 2001.

ROCHA, I.P. Carcinicultura brasileira: Situação atual e sugestões para a sua sustentabilidade. *Revista da ABCC* 2: p 26-28, 1999.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha - Desempenho em 2004. *Revista da ABCC* 2: p 38, 2005.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. E., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989.

SBORDONI, V., DE METTHAEIS, M., COBOLLI SBORDONI, M., LA ROSA, G., MATTOCCIA, M. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in

hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture* 57: 239-251, 1986.

SCHOLOTTERER, C. Evolutionary Dynamics of Microsatellite DNA. *Journal Chromosoma*, 6, 365-371, 2000.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L. Arlequin ver 2.000: A Software for Population genetics data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

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

SILVERSTEIN, J. T., REXROAD, C. E., KING, T. L. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture Research* 35, 40-48, 2004.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457 – 462, 1995.

SLETTAN, A., OLSAKER, I., LIE, O. Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from atlantic salmon (*Salmo solar* L.). *Animal Genetic* 24:195-197, 1993.

SOLÈ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S. R. (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução* p. 172 - 192; Ed. Holos, 2001.

SOTO-HERNÁNDEZ, J., GRIJALVA-CHON, J. M. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone, 1931) from northwest Mexico. *Aquaculture International* 12: 593–601, 2004.

SU, A. F. G., LARS-ERIK, A. L., GRAHAM A. E., GALL, B. Genetic and environmental variation of body weight in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 144: 71-80, 1996.

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* 97:110-115, 1991.

TABERLET, P. Biodiversity at the intraspecific level: The comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology* 64:91-100, 1998.

TAMAYO, R. J. M. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Master thesis - International Fisheries Management Department of Aquatic Biosciences, Norwegian College of Fishery Science - University of Tromsø, Norway, May 2006.

VALLES-JIMENEZ, R., CRUZ, P., PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from México to Panamá: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6:475-484, 2005.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA), (dG-dT), polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530, 1990.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction. *American Journal of Human Genetics*, V. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.

WOHLFARTH, G. W., LAHMAN, M., MOAV, R. *Badmidgeh* 32, pp. 3–5, 1980.

WOLFUS, G. M., GARCIA, O. K., ALCIVAR-WARREN, A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture* 152: 35-47, 1997.

XU, Z., PRIMAVERA, J. H., DE LA PENA, L. D., PETTIT, P., BELAK, J., ALCÍVAR-WARREN, A. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199: 13-40, 2001.

XU, Z., WYRZYKOWSKI, J., ALCIVAR-WARREN, A. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal Genetics* 30:150-156, 1999.

[HTTP://WWW.GAA/ SHRIMP OUTLOOK 2005 /](http://www.gaa/shrimp_outlook_2005/) FAO / GLOBEFISH, ACESSO EM: DEZEMBRO, 2006.

[HTTP://WWW.MERCADODAPESCA.COM.BR/NOTICIAS2.PHP?ID=3063](http://www.mercadodapesca.com.br/noticias2.php?id=3063), ACESSO EM: DEZEMBRO, 2006.

[HTTP://WWW.REVISTARURAL.COM.BR/EDICOES](http://www.revistarural.com.br/edicoes) , ACESSO EM: DEZEMBRO, 2006.

ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO *Journal of the World Aquaculture Society*

Guide for Authors

Papers submitted to the *Journal of the World Aquaculture Society* are considered for publication on the basis of scientific competence and the significance of the information to aquaculture. Authors should realize, however, that even an important study that is conducted using appropriate methodology may not be accepted for publication if the paper is poorly organized or difficult to understand. Beyond that, papers that are well written will be reviewed quicker and published in less time because there will be fewer revisions. Although most authors are concerned primarily with the acceptability of their paper for publication, there are two other important reasons to be concerned about the quality of your paper. First, the goal of publishing a journal article is to convey information from the writer to the reader. If your paper is difficult to read, other scientists may decide not to waste time trying to read it or, worse, they may read the paper but misinterpret the information. In short, a poorly written paper will not serve the only purpose for which it is written. There is also an important fiscal benefit to the Society when authors submit carefully prepared manuscripts. Publishing a scientific journal is expensive, and a significant part of that expense consists of charges for copyediting and making corrections at the proof stage. These costs can be dramatically reduced if authors are careful when they prepare papers for publication. Below are some comments and suggestions that will help you avoid some of the problems we routinely find in papers submitted to the *Journal*.

Read some good books on writing and graphics.

Writing is difficult, yet most scientists spend little time trying to improve their writing skills. Aside from practice, practice, practice, the best way to improve your writing is to read good writing, and lots of it. The next best way is to read books about good writing. In addition to the many excellent books on English grammar and writing, there are at least two books that should be read by all scientists. First is "How to Write and Publish a Scientific Paper" by Robert A. Day (1998, Oryx Press, Phoenix, Arizona, USA). This relatively inexpensive book is an excellent (and humorous) introduction to scientific writing. The second is the classic book on scientific graphics, "The Visual Display of Quantitative Information," by Edward R. Tufte (1997, Graphics Press, Cheshire, Connecticut, USA). Tufte's book is not a "how-to" guide for preparing effective illustrations; it is rather a straightforward and engrossing discussion of the theory and practice of statistical graphics.

Make sure that your paper conforms to the format outlined in our "Checklist for Manuscript Preparation."

Books about writing help develop your general writing style. However, each scientific journal has specific requirements (which vary from journal to journal) for the format and organization of manuscripts submitted for peer review. The formatting guidelines for manuscripts submitted to our Journal are listed in a "Checklist" printed on the last two pages of every March issue of the Journal. A copy of the "Checklist" is also posted at this website. You must submit a completed copy of the "Checklist" with your original submission. We occasionally change our guidelines so be sure to look at the "Checklist" printed in the most current March issue of the Journal.

Proofread your manuscript carefully to make sure that all typographical errors are corrected, that the text says exactly what you want it to say, and that all data entries in tables and figures are correct.

We do not allow changes at the proof stage unless they are needed to correct errors made during typesetting or composition. So make sure that the final version of the manuscript that you send the editor is perfect in every respect.

Make sure that the title page of your paper is in the correct format.

The manuscript title page should be the easiest part of a scientific paper to prepare, yet improper title page format is one of the most common problems in papers submitted to the Journal. Our copyeditor spends a considerable amount of time rewriting title pages so that they will be typeset correctly. An example of the proper title page layout is presented at the end of these guidelines. Note that the corresponding author is assumed to be the first-listed author unless there is a footnote to the contrary. To reduce ambiguity in indexing services, be sure to identify authors by at least one name (not just initials) in addition to the surname (family name). Example: use "Craig S. Tucker" instead of "C. S. Tucker." And do not abbreviate institutional affiliations in author's addresses. Examples: use "Universidad Nacional Autónoma de México" instead of "UNAM"; use "International Center for Living Aquatic Resources Management" instead of "ICLARM."

Make sure that all abbreviations for units of measure conform to those indicated on the inside back cover of the *Journal*.

A list of abbreviations that can be used without explanation is printed on the inside back cover of each Journal issue, beginning with March, 1999 (Volume 30, No. 1). Accepted abbreviations are also listed in our Editorial Policy at this website.

References to specific equipment or proprietary products must include the name and address (city, state or territory, and country) of the manufacturer or producer of the product.

Here is an example: "Dissolved oxygen was measure with a YSI Model 51 polarographic oxygen meter (Yellow Springs Instrument Company, Yellow Springs, Ohio, USA)."

Software used to conduct statistical analyses are tools and should be referenced like equipment, rather than as supporting evidence.

A correct citation for a statistical analysis might be "Data were analyzed by paired-comparison t-test (Steel and Torrie 1960) using SAS Version 6.1 software (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA)." In this example, the text by Steel and Torrie is referenced as supporting the choice of that particular statistical analysis and SAS is referenced only as the supplier of the tool used to conduct the analysis. The in-text reference to SAS is not, therefore, listed in the Literature Cited.

Cross-check literature citations in the text with the references listed in the Literature Cited section, and vice versa.

Incorrect reference citations are the most common problems we find in scientific manuscripts. References are often cited in the text or in tables but not listed in the literature cited, or references are listed in the Literature Cited but never cited in the text. In a recent paper submitted to the Journal, seven citations in the text were not listed in the Literature Cited and 31 references listed in the Literature Cited were not cited anywhere in the text. Cross-checking the references is easy: read the paper carefully and every time you come to a reference in the text, put a check by it in the text and next to the corresponding citation in the Literature Cited. If you find that a citation is mentioned in the text but is missing in the Literature Cited, make a note to add it. When you finish, make sure every citation in the Literature Cited has a check mark by it. If a citation is not checked, delete it.

Make sure all references are in the proper format.

Examples of the proper format for references are presented at the end of these guidelines. One key to citing references correctly is to remember that sufficient information must be given in the citation to allow a person to retrieve the publication. Note that we do not abbreviate anything in the citation except Co. (for Company), Inc. (for Incorporated), Ltd. (for Limited), USA, UK, and D.C.

Make sure references are in the correct order in the Literature Cited.

The following rules apply:

References are listed alphabetically by first author's surname. If two or more authors share the same surname, then the ordering is determined by a letter-by-letter comparison of the first author's initials (Example: Jones, A. K. precedes Jones, B. S.) ! If two or more works by the same author are listed, ordering is by date (Example, Jones, A. K. 1996 precedes Jones, A. K. 1998) ! If two or more works by the same first author are listed, ordering is as follows:

- all works published as single author (ordered by date), then
- all works published with two authors (alphabetized within this grouping), then
- all works published with three or more authors (alphabetized within this grouping).

Here is an example sequence determined by these rules:

Allman, D. 1972
Allman, G. 1970
Clapton, E. 1970

Clapton, E. 1975
 Clapton, E. 1975 and J. Hendrix 1968
 Clapton, E. and J. Hendrix 1972
 Clapton, E. and A. King 1970
 Clapton, E., J. Hendrix, J. Page, and E. Vedder 1973
 Clapton, E., C. Santana, and K. Richards 1987
 Clapton, E., P. Townshend, and G. Harrison 1971
 Knopfler M. 1980
 Vedder, E. 1992

Carefully proofread your tables for correct data entry and correct format.

Typographical errors, misplaced decimal points, and other simple mistakes are common in tables, so carefully check each entry in all tables to make sure they are correct. We prefer that you do not use superscript letters or numbers to indicate the results of a mean separation test (such as Duncan's Multiple Range Test, Tukey's HSD, or others). The preferred format is regular lower-case letters following the mean.

Here is an example line of data in a table:

Fish Weight (g)	484.6 ab	514.2 bc
	465.5a	600.3 c

Also be sure to indicate in the table heading (caption) whether comparisons are made within columns (up-and-down) or rows (reading across). For example, a typical sentence in the table heading explaining the mean separation test might read:

"Means in each row followed by different letters were found to differ at the 0.05 probability level by Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1960)"

Figures should be printed one per page, without page numbers or captions.

Captions should be on a separate page titled "Figure Legend." Each figure should be alone on a page. In pencil, lightly write the figure number in the lower right-hand corner of the figure. Do not insert figures into the text; do not put a page number on the figure; do not put a caption on the figure; and do not staple the figure to the manuscript. All figure captions should be listed sequentially on one page titled "Figure Legend."

Make sure that all illustrations are essential.

Computer graphics programs have made it easy to prepare visually appealing graphs and other line drawings. This convenience has a negative consequence, however, because many authors now use graphics when information can be more effectively presented in another way. For example, authors often use graphs to present data that are better suited for presentation in tables. Use graphs when the information is visual; that is, when the data show trends or when illustrations make large data sets coherent and interesting. If the goal is simply to present numbers, especially if the goal is to present exact numbers, then the data are best presented in tables. And never present the same data in tables and graphs: choose one or the other based on

the most effective means of conveying the information to the reader. Another common misuse of graphics is when graphs, especially bar graphs, are used to present only a few data points. Such information can often be presented in one sentence in the text, with considerable savings in expensive journal space.

Make sure that illustrations will withstand the photographic reduction required when the article is composed for printing in the *Journal*.

Graphs that look great when printed on full-sized paper may be incomprehensible when reduced to the size needed to fit them on a journal page. Simple graphs and figures are usually reduced to one-column width, which is approximately 7 cm (2.75 inches) wide. Complex figures, such as those containing several graphs within a single illustration, are usually printed across two columns, which is still only 14 cm (5.5 inches) wide. Thus, it is important to prepare illustrations so they look good when reduced to those smaller sizes. Use a type size large enough to be legible when reduced, do not present too much information in a single figure, and do not use hair-thin lines, small symbols, finely textured fill patterns, or other graphics that may disappear or become faint or indefinite when the illustration is photoreduced. Examples of handsome illustrations (as well as a good many abominations) abound in scientific journals: study them and try to emulate the style of those illustrations that are particularly effective.

Include an electronic copy of your manuscript when you send the Managing Editor the final draft of your paper.

Computer disks should be submitted only with final versions of papers that have been accepted for publication. The preferred medium is a 3½ diskette formatted for IBM-compatible (PC) to 1.44 MB capacity. Save files in Rich Text Format, an option available from most word-processing applications. The electronic version must match the hard copy exactly or publication may be delayed. The file should contain the title page, the abstract, the complete body of the text, the acknowledgements, references, and figure captions. Electronic versions of tables should not be included because tables are typeset from the hard copy. Clearly identify the disk with the senior author's name, short title, and the word-processing software and version number used to prepare the file.

FORMAT FOR THE TITLE PAGE OF A MULTI-AUTHORED PAPER

Effect of Salinity on the Growth Rate of

Penaeus setiferus in Ponds

Cristina Pascual and Evangelina Valera

Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma

México, Apartado Postal 69, Ciudad del Carmen, Campeche, México

Laida Ramos

Centro de Investigaciones Marinas, Avenida 1a, Numero 2808, Miramar, La Habana,
Cuba

Luis A. Soto

Laboratorio de Ecología del Bentos, Instituto de Ciencias del Mary Limnología,
Universidad Nacional Autonoma

México, México 04510, D.F. México

Jesse L. Tucker

Center for Reproduction and Culture of Penaeid Shrimp,

Humboldt State University, Arcata, California 95521 USA

Carlos Rosas¹

Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma

México, Apartado Postal 69, Ciudad del Carmen, Campeche, México

¹ Corresponding author (Note that no footnote is required if the first author is the corresponding author)

EXAMPLES OF SOME COMMON REFERENCE FORMATS

Article in a journal:

Glencross, B. D., D. M. Smith, and K. C. Williams. 1998. Effect of dietary phospholipids on digestion of neutral lipids by the prawn *Peneaus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29:365-369.

Book:

Boyd, C. E. 1982. *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands.

Stickney, R. R., editor. 1986. *Culture of non-salmonid freshwater fishes*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

APHA (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation). 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18th edition. American Public Health Association, New York, New York, USA. [Note: this would be cited in the text as (APHA 1992)]

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA. [Note: this would be cited in the text as (AOAC 1990)]

Article in an edited volume:

Ward, P. D. 1982. The development of bacterial vaccines for fish. Pages 47-58 in R. J. Roberts, editor. *Microbial diseases of fish*. Academic Press, New York, New York, USA.

Dissertation or Thesis:

Hynel, T. M. 1985. *Water quality dynamics in commercial crawfish ponds and toxicity of selected water quality variables to Procambarus clarkii*. Master's thesis. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Citations to abstracts, conference proceedings, government reports and other "grey" literature are discouraged in all scientific writing. Information from those sources is usually not subject to peer review and, more important, copies of the reference are difficult for readers to obtain. If, however, citations from these secondary sources are absolutely essential, make sure that sufficient information is presented in the citation to allow readers to access the publication. Follow these examples:

Paper published in a conference proceedings:

Author, B. B. 1997. *Aquaculture of tropical fish in the upper Michigan peninsula*. Page 42-48 in Finlayson, G. G., editor. *Proceedings of the Symposium on Aquaculture in Hostile Environments*. Traverse City, Michigan, USA, 2-4 May 1997. Publisher, publisher's city, publisher's state or territory, publisher's country.

Abstract published in a conference proceeding:

Author, B. B. 1997. *Aquaculture of tropical fish in the upper Michigan Peninsula (abstract)*. Page 316 in Finlayson, G. G., editor. *Proceedings of the Symposium on Aquaculture in Hostile Environments*. Traverse City, Michigan, USA, 2-4 May 1997. Publisher, publisher's city, publisher's state or territory, publisher's country.

Government report:

Author, B. B. 1997. *The use of garlic, onion, olive oil, and vinegar as fish disease therapeutants and salad dressings*. Technical Report No. 567, United States Food and Drug Administration, Washington, D.C., USA.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO periódico *Aquaculture Research*

Submission. One original and three copies of each typescript should be submitted to either of the editors:

Dr S J de Groot, PO Box 97, 2080 AB Santpoort-zuid, the Netherlands.

Dr Ronald W Hardy, Director, UI Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059 F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA.

Authors from the Americas, Japan, China, S E Asia and Australia may submit to Dr Hardy. Authors from all other countries may submit to Dr de Groot.

A disk should accompany the final version of the manuscript. Authors are requested to use an IBM-compatible system (see below for more details). All manuscripts must be accompanied by a valid email address.

Papers are accepted on the understanding that they have not been and will not be published elsewhere. Copyright of accepted manuscripts and all published material becomes the property of the Journal.

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Preparation of the manuscript. All sections of the typescript should be on one side of A4 paper, double-spaced and with 30mm margins. Line numbering and a font size of 12pt should be used. Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editor(s). Authors will receive prompt receipt of their paper and a decision will be reached within 3 months of receipt. A manuscript should consist of the following sections:

Title page. This should include:

the full title of the paper

the full names of all the authors

the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present address of the authors, if different from the above, should appear in a footnote)

the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be sent

a suggested running title of not more than 50 characters, including spaces
four to six keywords for indexing purposes

Main text. Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgments, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and address given.

All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgments, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin.

Units and spellings. Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL⁻¹. Use the form gmL⁻¹ not g/ml. Avoid the use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the *Concise Oxford Dictionary* published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific names and statistics. Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words together with authorities in brackets, e.g. 'rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)' but 'Atlantic salmon *Salmo salar* L.' without brackets. For further information see American Fisheries Society Special Publication No. 20, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada*.

Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

References (Harvard style). References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hemre (1990). Joint authors should be referred to in full at the first mention and thereafter by *et al.* if there are more than two, e.g. Hemre *et al.* (1990).

More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc. placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers.

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods of the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W.S. Ricker), pp. 199-214. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.

Utting, S.D. (1986) A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* **56**, 123-128.

Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text.

It is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript.

Illustrations and tables. These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig.1, Fig.2 etc. in order of appearance. Three copies of each figure should be submitted and each figure should be marked lightly on the back with its appropriate number, together with the name(s) of the author(s) and the title of the paper. Where there is doubt as to the orientation of an illustration, the top should be marked with an arrow.

Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling, including scale bars if necessary, should be clearly indicated on an overlay or photocopy. Magnifications should be included in the legend.

It is the policy of *Aquaculture Research* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a pdf from the internet. The web address for the form is: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf

If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor are@oxon.blackwellpublishing.com, and they will be able to email or FAX a form to you.

Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.

Line drawings should be on separate sheets of white paper in black indelible ink (dot matrix illustrations are not permitted); lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript. All symbols and abbreviations should be clearly explained.

Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

All tables and figures that are reproduced from a previously published source must be accompanied by a letter of permission from the Publisher or copyright owner.

Please send us digital versions of your figures. These should be supplied as eps or tif files only. See <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp> for further details.

Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse.

In the full-text online edition of the Journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Acknowledgments. These should be brief and must include references to sources of financial and logistical support.

Short Communications. These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report significant new data arising from problems with narrow, well defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should neither exceed 1500 words (approximately six pages of typescript) nor be divided up into conventional sections. When submitting Short Communications, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

Disks. The Journal encourages submission of accepted manuscripts on disk. These should be IBM-compatible. An accurate hard copy must accompany each disk, together with details of the type of computer used, the software employed and the disk system if known. *Do not justify.* Particular attention should be taken to ensure that any articles submitted in this form adhere *exactly* to the journal style in all respects. Further details can be obtained from the Publisher; the Editor(s) will supply 'disk submission' forms on acceptance of a manuscript. Disks will not be returned to the author.

Copyright. It is a condition of publication that authors grant Blackwell Publishing Ltd the exclusive licence to publish all articles including abstracts. Papers will not be passed to the publisher for production unless the exclusive licence to publish has been granted. To assist authors an exclusive licence form will be supplied by the editorial office. Alternatively authors may like to download a copy of the form [click here](#).

Correspondence to the Journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Page proofs and reprints. The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web

site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Only typographical errors can be corrected at this stage. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints. A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG
If you have any queries about offprints please email offprint@cosprinters.com

Author material archive policy. Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two issues after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.