

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Kláudia Emanuela Ramos Tenório

Avaliação da estrutura genética e populacional do camarão de água doce em extinção, pitu (*Macrobrachium carcinus*), no Nordeste como ferramenta para apoiar programas de repovoamento.

**Recife
2012**

Kláudia Emanuela Ramos Tenório

Avaliação da estrutura genética do camarão de água doce em extinção, pitu (*Macrobrachium carcinus*), no Nordeste como ferramenta para apoiar programas de repovoamento.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Profa Dra Maria Raquel Moura Coimbra (UFRPE)

Coorientador: Profa Dra. Girlene Fábila Segundo Viana (UFRPE-UAST)

Recife

2012

Kláudia Emanuela Ramos Tenório

Avaliação da estrutura genética do camarão de água doce em extinção, pitu (*Macrobrachium carcinus*), no Nordeste como ferramenta para apoiar programas de repovoamento.

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Valdir de Queroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rodrigo Augusto Torres
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Martin Alejandro Montes
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife
2012

Dedico esta dissertação á minha família, especialmente minha mãe Marta Ramos e minha irmã Karla Tenório, meus exemplos de vida. Sempre presentes, me ensinando a ter discernimento, coragem, fé e humildade. Sempre aplaudindo minhas vitórias e torcendo por mim. Para mim sempre serão as guerreiras, mulheres fortes, inteligentes e determinadas. Sem vocês eu nada seria.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa e pelo financiamento concedido ao projeto.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a Universidade Rural Federal de Pernambuco (UFRPE) pelos conhecimentos adquiridos

À Professora Dra. Maria Raquel Moura Coimbra, pela sua dedicação e ensinamentos, estes que foram além de textos ou bancadas.

Aos Professores Dr. Fábio B. Britto (UFPI), Dr. Fábio Diniz (EMBRAPA), Dr. Rodrigo Maggioni (UFCE), pelas orientações e colaboração neste trabalho.

À Professora Dra. Fábria Segundo Viana (UFRPE-UAST), por sua dedicação, co-orientação e ensinamentos. E a Nathane Jamily Mendes de Assis (UFRPE-UAST), por sua dedicação na realização dos estudos ecológicos.

Ao DNOCS do Ceará pelo apoio durante a coleta realizada neste estado.

Aos pescadores do Ceará, Alagoas/Sergipe, Bahia, Pernambuco pelas coletas, sem eles o trabalho não teria sido realizado.

Às colegas do Laboratório de Genética aplicada (LAGA), pela colaboração, pelo apoio e dedicação com que me ajudaram nesta jornada.

À amiga Suzianny Cabral, com um carinho especial, com seu jeito calado, em meio aos seus experimentos me mostrou que eu poderia contornar as dificuldades, e nas horas que mais precisei estive ali. Talvez ela nem imagine o quanto me ajudou a concluir este sonho.

À minha amiga quase irmã, Verônica Arns, obrigada por ter me escutado, apoiado e incentivado. Pelos choros e risos compartilhados, principalmente por suas críticas e orientações científicas, enfim sua amizade.

Aos meus amigos da UFPE do Laboratório de Bioinformática (LABBE), Carlos, Marcus Sergipe, Marcus Bahia, César, Tiago e Lidiane pelos inúmeros socorros, pelo carinho e companheirismo.

Aos amigos que fiz no Laboratório Central-UFPE (Patrícia, Rita, Dani, Heide e José Roberto) que me receberam de braços abertos, me acolheram e tornaram mais fácil os últimos experimentos.

À Thereza Liberal, sem você teria sido quase impossível, obrigada pela paciência, por ter ido doente me ajudar, pelas orientações e direcionamento.

À Fabiana e João (UFRPE), pelos livros, artigos e referências que me forneceram pela conversa informal nos corredores da UFRPE que acabava sempre no assunto *M. carcinus*.

Ao Professor Dr. Valdir Balbino (UFPE) por acreditar na minha capacidade, ter me incentivado desde a iniciação científica e por sua orientação mesmo não sendo meu orientador.

Às minhas amigas da EID que me incentivaram, aguentaram meu estresse, em especial a Veridiana Sales pelas orientações e questionamentos no meu texto e a Carolina Vasconcelos.

E por fim, não por ser menos importante, mas por causa da emoção que me dá ao escrever sobre pessoas tão presentes e importantes na minha vida, minha família. À minha mãe, Marta Ramos, guerreira que sem ela eu nada seria. Eu venci graças ao seu apoio, amor e dedicação. Seu exemplo é que me fez lutar, não desisti por você. Levo a vida “na ponta e calcanhar” como você me ensinou.

À Karla, irmã-mãe, amiga, companheira, que me deu amor, carinho, força e tantas coisas que as palavras são incapazes de expressar. O meu muito e eterno obrigada seria pouco para te dizer o quanto sou grata a você. Então, apenas te amo sempre, tanto e cada vez mais. E ao meu cunhado, Mário Jorge, que considero como um irmão, pelo espaço concedido, pelo carinho e apoio que sempre me deu, por tudo que fez por mim.

À minha prima-irmã, Ylka Barros, pelo apoio, amor, pelas lágrimas que secou, pelos inúmeros incentivos e abraços, e lógico pelas correções.

À minha prima Flávia Ramos pelo apoio, carinho e torcida, por ter me ajudar no início tudo na minha graduação e agora no fim do mestrado.

Aos meus irmãos e meu pai, Emygdio, Michele e Eduardo Tenório, cada uma da sua forma presente nesta etapa da minha vida. Obrigada por vocês existirem.

À Tia Cida, em memória, que me incentivou a entrar no mestrado, a lutar pelo meu sonho, a acreditar na vida. Um anjo que Deus enviou a Terra que me fez ver a vida como uma dádiva, sempre lembrando o respeito ao próximo, a caridade e o amor. Um dia Deus a levou de volta para seu lado e restou um amor incondicional que nada, nem o tempo, nem sequer a morte apagará, uma saudade eterna.

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças. (Charles Darwin)

Resumo

O camarão de água doce *Macrobrachium carcinus* (LINAEUS, 1758) pode ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, está distribuído desde o Pará até Rio Grande do Sul, em rios que deságuam no oceano Atlântico. Esta espécie tem sofrido com a sobrepesca, a poluição ambiental, a destruição dos ambientes naturais, barramento dos rios e riachos, os quais impedem o acesso ao mar impossibilitando o desenvolvimento dos estágios larvais do animal, além da introdução de espécies exóticas, como o *M. rosenbergii*. Por essas razões, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) inseriu o *M. carcinus* na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção em vários estados do Nordeste. Visando fornecer informações para as iniciativas de repovoamento, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e estrutura genética, bem como aspectos da ecologia desta espécie em quatro estados do Nordeste (Ceará, Pernambuco, Sergipe/Alagoas e Bahia), utilizando seis marcadores de microssatélites, dados biométricos e análises de conteúdo estomacal. Um total de 143 animais foi coletado, sendo de 32 a 40 animais para cada um dos rios avaliados. Após as análises, o número de alelos variou de dois a 18 alelos, com heterozigosidades médias esperadas e observadas de 0,6256 e 0,5985 respectivamente. Três dos seis *loci* estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg e apresentam alelos nulos em todas as populações. O valor total de F_{ST} foi de 0, indicando ausência de estruturação genética. Os estudos biológicos mostram que o pico reprodutivo mais provável para esta espécie ocorra em fevereiro. A análise estomacal revelou predominância de itens de origem vegetal.

Estes resultados sugerem que um único programa de repovoamento poderia fornecer pós-larvas a todos os rios da região Nordeste, diminuindo os custos de operação e garantido que rios distantes de laboratórios de multiplicação também sejam beneficiados.

Palavras-chave: *Macrobrachium carcinus*, microssatélite, repovoamento.

Abstract

The *Macrobrachium carcinus* (LINAEUS, 1758) can be found in tropical and subtropical regions. In Brazil, it is distributed from Pará to the Rio Grande do Sul, in rivers that empty into the Atlantic Ocean. This species has suffered with overfishing, pollution, destruction of natural environments, rivers and streams dams that block the access to the sea, what inhibits the development of larval stages of the animal, and the introduction of exotic species such as *M. rosenbergii*. Because these reasons, the Brazilian Ministry of Environment (MMA) has inserted the *M. carcinus* in the official list of endangered species in several Northeastern states like Piauí, Ceará, Pernambuco, Alagoas, Sergipe and Bahia. In order to provide information to restocking initiatives, the aim of this study was to assess the genetic diversity and structure, as well as aspects of ecology of this species in four regions of the Brazilian Northeast (Ceará, Pernambuco, Sergipe/Alagoas and Bahia), by the use of six microsatellite markers, biometric data and stomach content analysis. A total of 143 animals was collected, with 32-40 animals for each of the rivers evaluated. After the analyses, the number of alleles ranged from two to 18 alleles, with expected average heterozygosities from 0,6256 and observed average heterozygosities from 0,5985. Three of the six *loci* are in Hardy-Weinberg disequilibrium and present null alleles in all populations. The total value of F_{ST} was 0, what indicates no genetic structuration. Biological studies show that reproductive peak for this species most likely to occur in February. The stomach analysis revealed predominance of plant items. These results suggest that a single restocking program could provide post-larvae to all rivers of Brazilian Northeast, which reduce operating costs and ensure the benefit of the rivers that are distant from multiplication laboratories also.

Key words: *Macrobrachium carcinus*, microsatellite, restocking.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Distribuição Pantropical do Gênero <i>Macrobrachium</i>	18
Figura 2: Mapa da distribuição geográfica no Brasil de <i>M. carcinus</i>	20
Figura 3: Mapa das bacias hidrográficas do Brasil.....	21
Figura 4 : Adulto de <i>Macrobrachium carcinus</i> (Linnaeus, 1758).....	21
Figura 5: Fêmeas ovígeras mostrando as diferentes colorações dos ovos indicando seu estágio de maturação.	23
Figura 6:Classificação das Microsatélites (Weber, 1990)	27
Figura 7: Deslizamento da DNA polimerase, mostrando o processo normal de Replicação; O deslizamento da DNA polimerase para trás, originando a inserção de bases; e por fim o deslizamento da DNA polimerase para frente, surgindo às deleções. Fonte:Adaptado de Astrachan e Read, 1999.	28
Figura 8: Locais de amostragem de <i>Macrobrachium carcinus</i> para as análises genéticas.....	33
Figura 9: Extração do quinto par de pleopodos do <i>M. Carcinus</i> as margens do São Francisco.....	34
Figura 10: Coleta de <i>M. carcinus</i> utilizando covos, realizada no Rio São Francisco AL/SE	34
Figura 11: Locais de coleta das amostragens para os estudos de bioecologia.....	35
Figura 12: Resultado da estruturação populacional fornecida pelo Structure 2.3.3...46	
Figura 13: Variação do número de indivíduos de <i>Macrobrachium carcinus</i> coletados no baixo São Francisco de junho/2009 a junho/2010.....	48
Figura 14: Variação no número de machos e fêmeas de <i>M.carcinus</i> coletados de junho/2009 a junho/2010.....	48
Figura 15: Relação entre o número de fêmeas e fêmeas ovígeras no período de junho/2009 a junho/2010.....	49
Figura 16: Relação peso-comprimento de <i>Macrobrachium carcinus</i> coletadas no Rio São Francisco	50
Figura 17: Distribuição de frequência da percentagem da repleção estomacal de <i>Macrobrachium carcinus</i> coletados no Rio São Francisco, de junho/2009 a junho/2010.....	50

Figura 18: Frequência dos itens encontrados nos estômagos de *Macrobrachium carcinus* coletados no Rio São Francisco de junho/2009 a junho/2010. MOV = matéria orgânica vegetal não identificada, MOA = matéria orgânica animal não identificada.....51

Figura 19: Porcentagem mensal dos itens encontrados nos estômagos de *Macrobrachium carcinus* coletados no Rio São Francisco, de junho/2009 a junho/2010. MOV = matéria orgânica vegetal não identificada, MOA = matéria orgânica animal não identificada.....52

Lista de Tabelas

- Tabela I: Sequência dos Primers utilizados no Equipamento Genetic Analyzer com suas repetições e fluorocromos.....37
- Tabela II – Tamanho dos alelos e suas frequências (em parênteses) para cada *loci* analisado. Alelos raros das populações marcados em negrito.....44
- Tabela III : Variabilidade Genética da População *M. carcinus* do Ceará, Pernambuco, Alagoas/Sergipe, Bahia. N = Número de indivíduos coletados; A = Números de alelos; He = Heterozigosidade esperada; Ho =Heterozigosidade observada; HWE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; NA = Alelos Nulos45
- Tabela IV - Valores do F_{ST} par a par das populações de *Macrobrachium carcinus*. 46
- Tabela V – Número efetivo populacional (N_e) das populações de *Macrobrachium carcinus*.....47

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
ANA	Agência Nacional de Águas
ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
AFCR	Centro de Pesquisa De Pesca Anual
AMOVA	Análise de variância molecular
CPC	Centro de Pesquisa em Carcinicultura
DNOCS	Departamento Nacional de Obras contra a seca
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
F_{IS}	Coeficiente de endogamia
F_{ST}	Coeficiente de diferenciação genética
FAO	Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
H_e	Heterozigosidade esperada
H_o	Heterozigosidade observada
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MOA	Matéria Orgânica Animal
MOV	Matéria Orgânica Vegetal
N_e	Número efetivo
STRs	Repetições curtas em tadem

Sumário

Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de Ilustrações	X
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	XIII
1. Introdução	16
2. Revisão da Literatura	18
2.1 Gênero Macrobrachium	18
2.2 Macrobrachium carcinus	20
2.2.1 Distribuição Geográfica	20
2.2.2 Biologia	22
2.3 Genética de População	24
2.4 Genética de Macrobrachium	25
2.5 Microssatélites	26
2.7 Repovoamento	29
3. Objetivos	32
3.1 Geral:	32
3.2 Específicos	32
4. Material e Métodos	33
4.1 Amostragem	33
4.2 Extração do DNA genômico	35
4.3 Genotipagem	36
4.3.1 Eletroforese de Poliacrilamida	36
4.3.2 Genotipagem Automatizada	36
4.4 Análises estatísticas	39
4.5 Estudos bioecológicos	40
5.1 Análise Genética	42
5.2 Análise bioecológica	47
6. Discussão	53
7. Conclusões	56
8. Referências	57

1. Introdução

O camarão de água doce, *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) é um crustáceo decápoda, de água doce, pertencente à família Palaemonidae, popularmente conhecido como “pitu” no Nordeste brasileiro, e em outras regiões, como “lagosta de São Fidélis” ou “lagostinha do Ribeira”.

A espécie apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, sendo encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul, em rios que desembocam no Oceano Atlântico (Fievet, 1998; Magalhães, et al., 2003). Também ocorrem nos Estados Unidos (Flórida), México, América Central e Antilhas. É considerado um dos maiores camarões de água doce do Brasil, apresentando hábitos noturnos, vivendo em locas e com alimentação predominantemente detritívora. Possui a função de elo para as teias alimentares aquáticas, devido a sua participação ativa em diferentes níveis tróficos (Porto, 1988). O sabor agradável e o tamanho fazem dele uma iguaria, atingindo preços elevados no mercado.

As capturas da espécie vêm declinando devido à poluição, destruição dos ambientes naturais e sobrepesca, além da introdução de espécies exóticas como o *M. rosenbergii*. Tais fatores inseriram o *M. carcinus* na lista das espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente (<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>) para os estados do Pará, Piauí, Ceará, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A recuperação de estoques de águas continentais é normalmente feita através de ações de repovoamento em que pós-larvas são liberadas no ambiente selvagem. O objetivo das larviculturas de repovoamento é aumentar a produção de camarão no

ambiente, conservando a diversidade genética das populações selvagens. Além disso, o conhecimento genético deve ser atrelado a princípios ecológicos a fim de que a integração pretendida entre as pós-larvas da larvicultura e as do ambiente selvagem ocorra de fato.

Pelo menos duas iniciativas de produção de pós-larvas de pitu para repovoamento já ocorreram no Nordeste em momentos e locais distintos, sem que fossem acompanhadas por levantamentos genéticos ou ecológicos da espécie.

O objetivo deste projeto foi caracterizar geneticamente, através de marcadores de microssatélite, quatro populações de pitu no Nordeste (Ceará, Pernambuco, na divisa entre Alagoas e Sergipe, Bahia). Aspectos ecológicos da espécie também foram investigados na região do baixo São Francisco, alvo de um programa de repovoamento.

2. Revisão da Literatura

2.1 Gênero *Macrobrachium*

O gênero *Macrobrachium* (Bate, 1868) pertence à ordem Decápoda e família Palaemonidae, apresenta ampla distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais, habitando ambientes dulcícolas e estuarinos (Pereira et al., 2002; Short, 2004). Este gênero possui mais de 200 espécies descritas como pantropicais, que habitam as planícies da África, Ásia, Oceania, América do Norte, Central e Sul (Figura 1) (Valencia et al., 2007). Na América do Sul são encontrados na Venezuela, Colômbia, Guianas e Brasil (Holthuis, 1980, 1993; Melo, 2003; Valencia e Campos, 2007). Os estudos mostram que este gênero não ocorre no continente Europeu e Antártico (Coelho et al, 1982).



Figura 1: Distribuição Pantropical do Gênero *Macrobrachium*
Fonte: <http://planetageo.sites.uol.com.br/fmapas.htm> . Acesso em 28 de fevereiro 2012.

No Brasil são conhecidas 18 espécies (Sampaio et al.,2009) amplamente distribuídas nas bacias hidrográficas brasileiras (Melo, 2003).

O gênero *Macrobrachium* possui três tipos de desenvolvimento classificados de acordo com o número de estágios larvais e a quantidade e tamanho dos ovos (Jalihal et al., 1993): 1) Prolongado ou Tipo Normal – Estas espécies buscam regiões de estuários devido à necessidade da alta salinidade para sua metamorfose, liberam grande quantidade de ovos, de tamanho pequeno e apresentam de 8 a 20 estágios larvais, ou seja, um longo período de desenvolvimento larval com vários estágios de zoea, até chegar à fase juvenil. Em geral, exibem dimorfismo sexual, sendo os machos maiores que as fêmeas, exemplos: *M. acanthurus*, *M. carcinus*, *M. rosenbergii* e *M. olfersi*; 2) Parcialmente Abreviado – São espécies sem dimorfismo sexual, tamanho médio, habitantes de rios, córregos e águas represadas, que possuem apenas 2 ou 3 estágios, produzem ovos grandes, em pequena quantidade, e têm desenvolvimento larval abreviado exemplos: *M. borellii*, *M. nattereri* e *M. potiuna*; 3) Completamente Abreviado – Completamente Abreviado – Também não apresentam dimorfismo sexual, apresentam ovos grande, pouco numerosos e são de indivíduos de tamanho médio, entretanto, do embrião eclode um camarão juvenil. Seus representantes são duas espécies da Índia, exemplos: *M. hendersodayanum* e *M. dayanum*.

No estudo da biologia deste gênero são encontrados animais dióicos, que apresentam dimorfismo sexual e fecundação externa. O macho deposita o espermatóforo nas proximidades do poro genital feminino e a fêmea expulsa os óvulos para a região abdominal, onde são fertilizados. Os ovos fecundados são aderidos aos pleópodos até seu desenvolvimento. Passam por diversas metamorfoses nos estágios larvais e em seguida ficam semelhantes aos adultos, recebendo o nome de pós-larvas (Valenti,1985).

Quanto ao comportamento apresentam hábitos crípticos, com intensa atividade ao entardecer e início da noite, permanecendo durante o dia em abrigos formados por pedras, buracos ou entre as vegetações submersas (Mossolin e Bueno, 2003).

2.2 *Macrobrachium carcinus*

2.2.1 Distribuição Geográfica

M. carcinus é um camarão dulcícola (Figura 4), considerado um dos maiores camarões nativos do Brasil, sendo encontrada em seis bacias hidrográficas brasileiras (bacia Amazônica, bacia do Parnaíba, Atlântico Nordeste ocidental, Atlântico Nordeste oriental, São Francisco, bacia do Leste, Atlântico sudeste e Atlântico Sul), nos estados do Pará ao Rio Grande do Sul, em rios que desembocam no Oceano Atlântico (Figura 2) (Fievet, 1998; Magalhães, et al, 2003).



Figura 2: Mapa da distribuição geográfica no Brasil de *M. carcinus*

Destas bacias hidrográficas, três estão localizadas na região Nordeste do Brasil (Atlântico Nordeste, São Francisco e bacia do Leste). A bacia do Atlântico Nordeste oriental compreende as áreas dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, parte dos estados da Paraíba, Pernambuco e Alagoas (Brasil A, 2010). A bacia do

São Francisco está localizada nos estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe (Brasil B, 2010). Já a bacia do Atlântico Leste é distribuída nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Sergipe e Bahia (Brasil A, 2010) (Figura 3).



Figura 3: Mapa das bacias hidrográficas do Brasil.

Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/bacias-hidrograficas/bacia-hidrografica.php>



Figura 4 : Adulto de *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758)

Fonte: <http://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=717&pic=34497>

2.2.2 Biologia

O adulto do *M. carcinus* atinge um comprimento total de 170–250 mm para os machos e para fêmeas ovígeras, de 130 a 170 mm. Possui um rostro curto, parcialmente curvado para cima na extremidade, margem superior com 10 a 14 dentes (mais de 16 em juvenis) distribuídos uniformemente, 4 a 6 atrás da órbita, margem inferior com 3 a 4 dentes. Para distinção morfológica desta espécie pode se usar a proporção dos segmentos do quelípodo (estrutura formada por mero, carpo, palma e dedo), onde o carpo é bem menor do que o mero e que a palma. Quanto a coloração, apresentam um padrão de faixas longitudinais amarelas e pretas exclusivo da espécie (Melo, 2003, Coelho et al., 1982).

O dimorfismo sexual é caracterizado por machos maiores, com garras mais desenvolvidas e um apêndice no segundo segmento abdominal, enquanto as fêmeas possuem pleuras abdominais arqueadas e alongadas, responsáveis pela formação da câmara de incubação (Coelho et al., 1982).

A reprodução desta espécie ocorre por fecundação externa, durante todo ano, contudo, especialmente nos meses chuvosos, de fevereiro a março (Valenti et al., 1989). Além disso, possui alta taxa de fecundidade e fertilidade (Lobão et al., 1983), com período de incubação de cerca de 20 dias, com uma postura de 10.000 a 80.000 mil ovos/ postura, sendo um dos maiores períodos de incubação e maior postura do gênero. (Coelho et al., 1982).

A maturação dos ovos é observada pela mudança na coloração e o grau de desenvolvimento embrionário. Os ovos de *M. carcinus* inicialmente apresentam a cor coral, seguindo amarelo suave e posteriormente marrom (Figura 5) quando já é possível visualizar os olhos dos embriões (Coelho et al., 1982).



Figura 5: Fêmeas ovíferas mostrando as diferentes colorações dos ovos indicando seu estágio de maturação.

O desenvolvimento é anamórfico irregular produzindo numerosos e pequenos ovos, com um longo período larval. O período de desova dura em torno de 19 a 48 horas, e as larvas planctônicas passam por 12 estágios de zoea, influenciados pelo tipo de alimentação e salinidade. Em laboratório, a duração dos estágios larvais é de 45 dias (Coelho, 1982; Herman et al. 1999).

O crescimento nesta espécie é realizado em períodos de exuviação ou mudas devido ao exoesqueleto. A cada etapa do crescimento ocorrem mudanças nos hábitos alimentares e no hábitat. Vive em águas com temperatura de 15° a 36°C e é encontrado em remansos ou cavidades, com elevada turbulência, devido a exigência de uma maior oxigenação da água que outras espécies do mesmo gênero, em um pH de 7.0 a 8,5 (Coelho et al., 1982) e com salinidade ideal de 16 ppt (Herman et al.,1999)

Sampaio et al., (2009) citam o *M. carcinus* como uma espécie pertencente a macrofauna bentônica, com hábitos noturnos, que utiliza os pereiópodos para se locomover, vivendo no fundo dos rios, lagos, reservatórios e estuários. Em observações laboratoriais, Coelho et al (1982) verificaram que o *M. carcinus* utiliza

os quelípodos para conduzir os alimentos à boca, sendo estes também usados para higiene do próprio corpo, inclusive nas fêmeas que realizam a limpeza nos ovos aderidos aos pleópodos.

A espécie é considerada onívora, alimentando-se de pequenos crustáceos, insetos, moluscos, plantas e detritos orgânicos (Santos, 2009).

Nas populações de *M. carcinus* é estabelecida uma hierarquia, onde os machos maiores são dominadores e os menores submissos com ocorrência eventual de combates para determinar a função de cada indivíduo no grupo (Coelho et al, 1982). A espécie é considerada agressiva e territorialista, além de ter um comportamento comum diante de espécies predadoras, seguindo uma sequência de eventos, iniciando com a projeção do corpo para trás, depois posição de defesa ou combate, autonomia (processo de auto-amputação de pereiópodos) e fuga (Coelho et al., 1982; Lewis et al., 1996 ;Kutty e Valenti, 2010).

O tempo de vida do *M. carcinus* é de 6 a 8 anos, sendo para *M. rosenbergii* de até 3 anos, enquanto espécies menores vivem aproximadamente dois anos (Brown et al., 2010).

2.3 Genética de População

Segundo Beiguelman (2008), Genética de Populações é o ramo da Genética que tem como objetivo investigar a dinâmica dos genes nas populações naturais, buscando justificativa para os mecanismos que alteram a composição gênica (mutações, seleção natural, deriva genética e fluxo gênico) ou apenas a frequência genotípica pelo aumento do número de homozigotos (efeito dos acasalamentos consanguíneos , efeito de gargalo e efeito fundador).

Como ferramenta para análises da variação genética podem ser usados diversos tipos de marcadores moleculares como: genes mitocondriais, Y-específicos, marcadores nucleares e microssatélites. Os dois primeiros têm herança materna e paterna, respectivamente, herança não mendeliana e poder discriminatória sobre a biodiversidade, filogenética e biogeografia. Enquanto os dois últimos apresentam herança mendeliana sendo considerados ótimos marcadores para estimar distância genética, a ocorrência de metapopulações e testes de paternidades (Eriksson et al. ,2006; Garrigan; Hammer, 2006).

A genética de população lida com as leis Mendelianas e outros princípios genéticos e como eles afetam as populações. Ela inclui o estudo das forças que resultam em mudanças evolucionárias em uma espécie no tempo (Hartl e Clark, 1997). Vários parâmetros podem ser analisados com intuito de identificar e quantificar as variações genéticas como o equilíbrio de Hardy-Weinberg, F_{ST} , F_{IS} , heterozigosidade esperada e observada e tamanho efetivo populacional.

O teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg supõe que em uma população infinita, os cruzamentos sejam aleatórios desde que não ocorram mutações, migrações e seleção natural. Este parâmetro é analisado através de inferências estatísticas, onde são comparadas as heterozigosidades esperadas e observadas. O desvio das proporções esperadas indica que existem fatores atuantes que estão levando ao desequilíbrio como mutação, fluxo gênico (migração) e seleção natural ou um processo dispersivo, como a deriva genética (Falconer; Mackay, 1996).

A variação genética de uma população pode ser afetada por diversas características genéticas, além de sofrer influência dos fatores ecológicos e da história de vida de cada espécie (Brown, 1978; Hamrick, 1983).

2.4 Genética de *Macrobrachium*

Os estudos genéticos existentes sobre o gênero *Macrobrachium* utilizam vários tipos de marcadores moleculares como marcadores de microssatélites, DNA mitocondrial e aloenzimas. Sendo as espécies *M. rosenbergii* e *M. nipponense* as que têm o maior número de estudos realizados devido à importância comercial mundial que ambas possuem.

O *M. nipponense* é uma espécie de grande importância para aquicultura na China. Sua produção encontra-se em declínio devido à perda de variabilidade genética. Esta espécie possui mais de 40 *loci* de microssatélites descritos na literatura, com o número de alelos variando de dois a 25, apresentando heterozigosidade esperada geralmente menor que a observada, desequilíbrio de Hardy-Weinberg, e relatar a presença de alelos nulos (Quiao et al., 2011; Feng e Li, 2008; Ma et al., 2010; Zhao et al., 2010).

Já o *M. rosenbergii*, espécie oriunda da região sudeste asiático, mas introduzida em diversos países inclusive no Brasil. Existem estudos genéticos

utilizando marcadores moleculares de microssatélite com o número de alelos variando de dois a 19, heterozigosidades esperadas maiores que as observadas, presença de alelos nulos e desequilíbrio de Hardy-Weinberg (Chand et al., 2005; Divu et al., 2008; Charoentawee et al., 2006) . Mather e Bruyn (2003), em um estudo com DNA mitocondrial, relatam que o *M. rosenbergii* vem perdendo diversidade genética em cultivos, relacionada à história da fundação destas populações que expõem a espécie a efeito fundador repetido.

O estudo realizado por Cook et al., (2002) utilizando o *Macrobrachium australiense* mostrou que a espécie apresenta uma alta estruturação genética. A justificativa para este fato é a ausência de fluxo gênico na região estudada mesmo com relevo topográfico baixo e a presença de inundações periódicas.

Entretanto, o estudo realizado por Sharma e Hughes (2009) com o *Macrobrachium australiense* e o *Macrobrachium tolmerum*, utilizando aloenzimas e DNA mitocondrial mostrou que espécies que co-habitam a mesma região podem ter estruturação genética diferentes, apesar de sofrerem com os mesmo processos geológicos e ambientais. Para o *M. australiense* foi encontrada uma maior estruturação genética justificada pela limitação de dispersão da espécie associada à ocorrência de muitas gerações. Já para o *M. tolmerum*, o estudo mostrou a existência de população homogênea, com uma recente expansão populacional e evidências de que há fluxo gênico apesar de limitado.

Hunter (2011) não encontrou evidências de estruturação populacional em *Macrobrachium lar*. O autor cita que a diferenciação geográfica encontrada não foi significativa e justifica seus resultados pela presença de fluxo gênico gerado pela habilidade dispersiva da espécie, ou ainda por eventos naturais como alterações no nível do mar que possibilitaram a dispersão larval. Ainda afirma que a estruturação genética está intimamente relacionada à história de vida de cada espécie e que hábitos anfídromos geram um alto potencial de dispersão. (Hunter, 2011)

2.5 Microssatélites

Os microssatélites são sequências repetidas, também chamadas de STRs (*short tandem repeats*) ou repetições curtas em tandem, que foram descritos por Litt e Luty (1989); Tautz (1989); Weber e May (1989). De acordo com Chambers et al., (2000), ainda não há um consenso sobre o tamanho que diferencia os

As repetições do tipo CA são mais comuns que as repetições AT e sendo três vezes mais observadas do que as repetições AG. As mononucleotídicas são pouco estudadas devido aos problemas com amplificação e a dificuldade na sua detecção. Considerando as repetições trinucleotídicas, as mais frequentes são GAG e AAT, sendo esta última mais comum em invertebrados. A ocorrência de cada tipo de repetição pode estar associada ao processo de deslizamento ou *slippage* (Figura7), no qual a DNA polimerase pode inserir ou deletar bases na replicação, ou ao conteúdo GC baixo em alguns grupos (Li et al., 2002). Além, do mecanismo citado acima, outro mecanismo também pode gerar diferentes microssatélites como a permuta ou *crossing over* desigual que ocorre entre cromossomos homólogos na prófase I da meiose (Foissac et al., 2001).

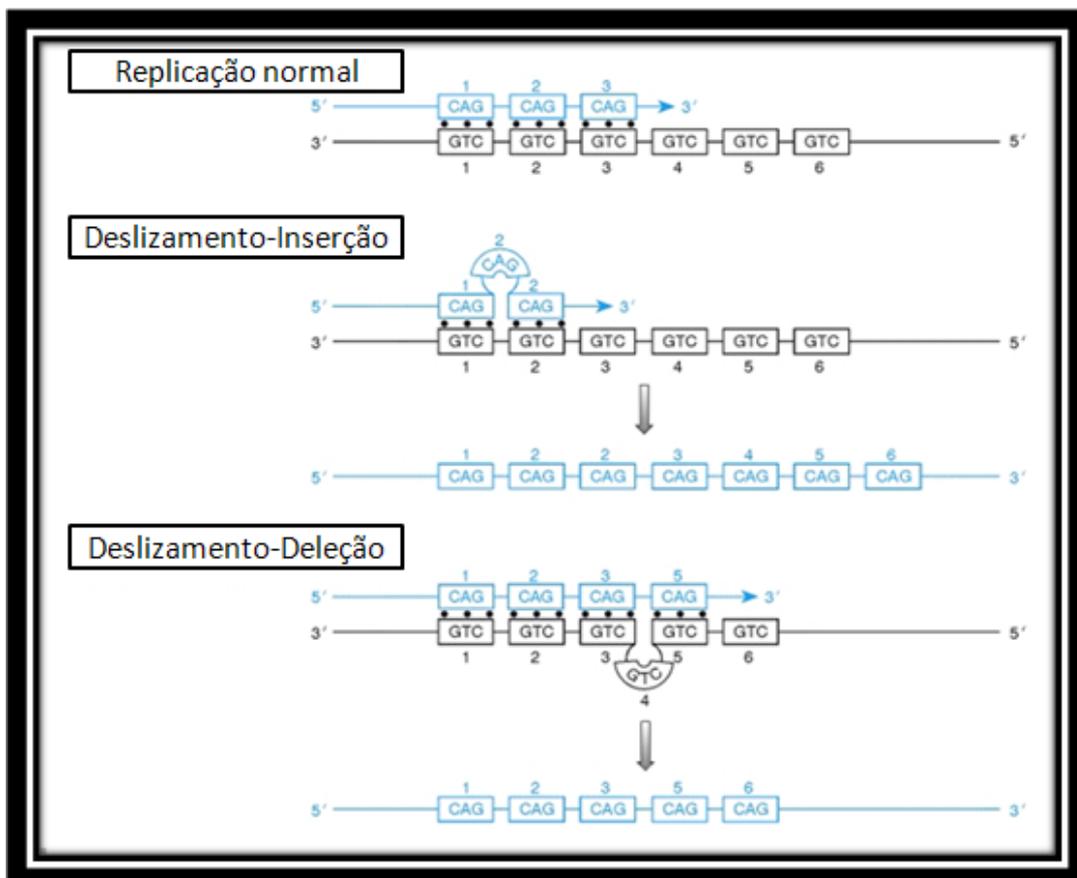


Figura 7: Deslizamento da DNA polimerase, mostrando o processo normal de Replicação; O deslizamento da DNA polimerase para trás, originando a inserção de bases; e por fim o deslizamento da DNA polimerase para frente, surgindo às deleções. Fonte: Adaptado de Astrachan e Read, 1999.

O polimorfismo observado nos microssatélites pode ser decorrente da variação alélica no número de repetições nas sequências consideradas perfeitas,

como também podem refletir mutações em regiões flaqueadoras e ou sequências com repetições interrompidas (Ellegren, 2004). As regiões flaqueadoras dos microssatélites são geralmente conservadas, possibilitando o desenho de *primers* específicos, que permitem a utilização da técnica de PCR.

Estas sequências com padrão de herança mendeliana, co-dominantes, considerados marcadores neutros são amplamente utilizados nos estudos de variabilidade genética, em testes de paternidade, avaliação filogenética, genética forense, no mapeamento de caracteres quantitativos de importância econômica (Arranz et al., 1998; Diez-Tascon et al., 2000; Arranz et al., 2001; Coltman et al., 2001; Mcrae et al., 2002; Denise et al., 2003; Alvarez et al., 2004; Barrilet et al., 2005; Tapio et al., 2005; Alvarez et al., 2006; Uzun et al., 2006).

A utilização dos marcadores de microssatélite é mais vantajosa devido a vários fatores, entre eles, a alta reprodutibilidade, necessidade de pequena quantidade de DNA, abundância no genoma e alto polimorfismo (Oliveira et al., 2006, Ellegren, 2004). Outra característica importante dos marcadores de microssatélites é que devido a sua alta taxa de mutação eles são capazes de recuperar informações de um passado recente como efeitos gargalos recém-gerados (Selkoe e Toonen, 2006).

Contudo, desvantagens também são apontadas como a presença de homoplasia, processo em que alelos diferentes apresentam mesmo tamanho, porém história diferente, induzindo a subestimação da divergência genética entre populações que estejam distantes geograficamente. E por fim, a presença de alelos nulos que pode indicar um excesso de homozigotos, quando na verdade representam mutações na sequência flaqueadora que impossibilitam o anelamento do primer (Satar,2009; Chambers e Macavoy, 2000; Schlötterer, 2004; Selkoe e Toonen, 2006).

2.7 Repovoamento

No mundo, cerca de 70% dos recursos pesqueiros estão sobreexplorados, em declínio ou se recuperando do declínio (FAO, 1995). Em ambientes aquáticos, a

propagação artificial de juvenis tem sido amplamente utilizada para a recuperação de estoques extintos ou sob ameaça de extinção (Allendorf e Ryman, 1987). Entretanto, ecologistas e geneticistas têm se questionado sobre os possíveis efeitos destas propagações nos ambientes selvagens, uma vez que a introdução de genótipos não representativos da população original podem ter efeitos desastrosos (Ward, 2006). Além disso, o cruzamento entre indivíduos de populações distintas pode resultar na perda da identidade populacional reduzindo o “fitness” devido à ruptura das adaptações locais.

Em um estudo em que foram revisados cinquenta anos de artigos sobre programas de repovoamento, Araki e Schmid (2010) observaram que existem efeitos negativos sobre este processo como menor sobrevivência, menor aptidão e redução da variabilidade genética em peixes. Por outro lado, em algumas populações os efeitos do repovoamento foram positivos, mostrando que os resultados dependem do estoque, da população e da disponibilidade de informações acerca da ecologia e genética da espécie.

A variabilidade genética é essencial para manter a capacidade dos repovoados em se adaptar às mudanças ambientais. Portanto, se o objetivo de um programa de repovoamento é a persistência da espécie em longo prazo, então a preservação da variabilidade genética deve ser a prioridade máxima.

Três premissas devem ser consideradas em programas de repovoamento, segundo Miller e Kapuscinski (2003):

- 1) Sem aderência a princípios genéticos, evolucionários e ecológicos, a integração pretendida entre os repovoados e a população selvagem podem ter consequências adversas;
- 2) O monitoramento constante é necessário para avaliar o sucesso;
- 3) O repovoamento deve ser visto apenas como uma parte das ações mitigadoras, restando ainda estratégias de defeso e cotas de captura, entre outras.

A propagação artificial de juvenis de sistemas de cativeiro para ambientes selvagens pode ser de três tipos de acordo com o status da população: 1) repovoamento (recuperação da biomassa desovante de espécies severamente exploradas; 2) suplementação (aumento das capturas em estoques em que a pesca ocorre) (Cowx, 1998) e 3) re-introdução (recuperação da biomassa quando a população foi extinta) (Lorenzen, 2011).

Duas iniciativas de repovoamento de populações da espécie de *M. carcinus* já ocorreram no Brasil em pequena escala, uma no Ceará e uma em Alagoas. No Ceará o Centro de Pesquisas em Carcinicultura nos anos de 2003-2007 dominou o ciclo de produção em cativeiro do *M. carcinus* e conseguiram o ciclo completo da espécie por duas vezes. As pós-larvas produzidas foram introduzidas nas lagoas do Cauípe, em Caucaia, e nos açudes Pentecoste, Curu e Jaibara. Entretanto, a atividade de repovoamento foi interrompida por falta de recursos (DNOCS, 2008).

Já em Alagoas foi realizada uma parceria entre Chesf/UFRPE/Instituto Xingó para a produção de pós-larvas desta espécie no intuito de repovoar o Baixo Rio São Francisco em 2006. Houve a tentativa de estruturar um Laboratório de Produção Pós-Larvas no município de Piranhas/Alagoas. Entretanto, até o momento, não existiu nenhum estudo que revele a estrutura das populações de *M. carcinus* do Nordeste.

Tais informações, tanto as ecológicas como as genéticas, são importantes para subsidiar as ações de repovoamento. A primeira nortearia sobre os possíveis locais indicados para a soltura das espécimes, possibilitando uma maior sobrevivência devido a presença de alimentos adequados em cada estágio de vida, um ambiente em que os indivíduos possam se proteger dos seus predadores, a espécie habita rios pedregosos e com águas turbulentas, inseri-los na mesma época em que os animais de ambiente natural estejam se reproduzindo para que haja uma interação entre ambos. Já, as informações genéticas são necessárias para minimizar a perda da variabilidade genética que pode provocar uma baixa sobrevivência dos repovoados e causar danos irreversíveis a população (POVH et al., 2008). A variabilidade possibilita maior adaptação às mudanças ambientais por várias gerações

3. Objetivos

3.1 Geral:

Avaliar a diversidade e estrutura genéticas de populações de *M. carcinus* pertencentes a quatro rios do Nordeste brasileiro oriundos de três bacias hidrográficas, usando marcadores de microsatélite, além de investigar aspectos ecológicos vinculados a reprodução e alimentação da espécie no baixo São Francisco, alvo de um programa de repovoamento.

3.2 Específicos:

- Genotipar seis *loci* de microsatélite para cada uma das quatro populações.
- Determinar o parâmetros genéticos, tais como número de alelos, heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada, desequilíbrio de Hardy-Weinberg, coeficiente de endogamia (F_{IS}), índice de diferenciação genética F_{ST} , Número efetivo populacional (N_e).
- Obter parâmetros biológicos, tais como proporção sexual, distribuição em comprimento e peso, período de reprodução, conteúdo estomacal.

4. Material e Métodos

4.1 Amostragem

Para a análise genética foram coletados camarões em quatro localidades: 40 indivíduos no baixo Rio São Francisco-divisa Alagoas/Sergipe (município de Piaçabuçu 10°24'S, 36°26'O), 34 indivíduos no Rio Una em Pernambuco (município de Barreiros 8° 48' 28" S, 35° 11' 24" O), 36 indivíduos no Rio Curu no Ceará (município de Pentecostes 03° 47' 34" S 39° 16' 12" O), 38 indivíduos no Rio de Contas no estado da Bahia, município de Ubaitaba (14° 18' 33" S e 39° 19' 30 W) (Figura 8).



Figura 8: Locais de amostragem de *Macrobrachium carcinus* para as análises genéticas.

Fonte: Adaptado do <http://pt.wikipedia.org/wiki/>

Imediatamente após a coleta, o 5º par de pleópodos dos 148 espécimes *M. carcinus* foram removidos e preservados em etanol a 95% sem comprometimentos à sobrevivência (Figura 9).



Figura 9: Extração do quinto par de pleopodos do *M. Carcinus* as margens do São Francisco

Para análise dos aspectos bioecológicos foi coletado um quilograma de camarões a cada dois meses, iniciando em junho de 2009 e terminando em junho de 2010. A coleta foi realizada através de covos (Figura 10), que continham iscas de coco em três localidades do baixo Rio São Francisco, às margens das cidades de Piaçabuçu, Propriá e Pão de Açúcar (Figura 11).



Figura 10: Coleta de *M. carcinus* utilizando covos, realizada no Rio São Francisco AL/SE

4.3 Genotipagem

A otimização de 42 *loci* foi conduzida na população da coleta de Alagoas e Sergipe (município de Piaçabuçu). As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 10 µL, contendo 50 ng de DNA, 10 pmoles de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de *Taq* polimerase platinum (Invitrogen ®) e 1,5 mM ou 2,5 mM de MgCl₂. Foram testados diferentes ciclos de PCR, variando-se temperatura de anelamento e concentração de MgCl₂ até que padrões claros e reproduzíveis fossem obtidos. As amplificações foram realizadas na seguinte condição: uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos e temperatura de anelamento (55°C a 67 °C) por 30 segundos, 72°C por 1 minuto seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.3.1 Eletroforese de Poliacrilamida

Inicialmente, a otimização dos *loci* foi feita em géis de poliacrilamida consistindo de uma pré-corrída inicial durante 1 hora, a 2000 V, 60MA e 55W. Em seguida, foram aplicadas as amostras e uma régua molecular de 10bp (Invitrogen) e com os mesmos parâmetros da eletroforese anterior com duração de 1 hora e 30 minutos. Ao término da corrida, o gel de poliacrilamida a 4%, 5% e 6% , de acordo com o tamanho do fragmento, foi fixado com ácido acético (10%) durante 20 minutos, seguido de coloração com nitrato de prata a 0,1% durante 30 minutos e revelado com carbonato de sódio. A imagem foi registrada em um scanner (Kodak®).

4.3.2 Genotipagem Automatizada

Os melhores marcadores com melhor resolução na poliacrilamida foram avaliados por um sistema automatizado de eletroforese de capilar, no equipamento Genetic analyzer ABI 3500 (Applied Biosystems ®).A seleção foi feita considerando os seguintes fatores: *loci* polimórficos , com número maior de alelos e por fim os *loci* que apresentaram tamanho maior que 330 o que impossibilita sua análise em poliacrilamida. Um dos iniciadores de cada par de *primer* foi marcado com fluorocromos(Tabela1).

Tabela I: Sequência dos Primers utilizados no Equipamento Genetic Analyzer com Seus motivos e fluorocromos.

Loci	Ta (° C)	Forward	Reverse	Motivo	Fluorocromo
Mcar03	57	CAATTTGATGGGCAATCTCAC	CTCATTAGGAGAGATAGGGAGAG	GA	VIC
Mcar05	56	AAGTCGACTGTCTAAAAATGC	GGAGAGACAAGCAAAAGATG	GA	NED
Mcar09	65	AGAGATGGGGACTGGGAGAT	CTGTTCCCTCCTTCTCTCTCAC	GATA	VIC
Mcar13	57	CCTCTCTAATGAGTCGTTAAG	CTGGGGTAGCAACTTGG	TGTC	PET
Mcar15	57	ATTCGTTTCGAAATGTTAGTAAG	CAGCGGAGTGGGTTTACAAT	AG	FAN
Mcar18	63	GCTGTGAGCTAAACGCAC	GGCGCTGTTAGTTTCAGA	AG	FAN
Mcar19	65	GTCGGGCTGTTTGTGTTGTC	CCTCTGAGCACACTGCTTTG	TGTC	FAN
Mcar25	57	TCCGGAGATTACAGGTAGGC	GAATCACCAACTAGGCCG	TGTC	PET
Mcar39	65	GAAGCCAAAATAAATGTCCTGC	ACACCGGATCAAATATCCACTC	GACA	NED
Mcar46	58	TCATCTCAATCTCCTCCTCTAACA	ATTATGTCTCCGTGTGTTTCCA	TGTC	NED

O equipamento Genetic analyzer foi calibrado utilizando os calibradores DS-33 e DS-02 (Applied Biosystems®) que são específicos para os fluorocromos utilizados. A escala alélica GS600 (Applied Biosystems®) foi utilizada para determinar o tamanho dos fragmentos analisados. As reações de PCR seguiram o mesmo protocolo da eletroforese em acrilamida com uma modificação no tempo de extensão maior (30 minutos) e na utilização da *Taq* polimerase que foi a recombinant (Invitrogen ®). O tamanho dos produtos foi analisado utilizando os programas GENESCAN 3.7 e GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

4.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional GENEPOP 1.2 (Raymond e Rousset, 1995), onde número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o), ou seja, a porcentagem de indivíduos heterozigotos em um dado loco gênico, a esperada (H_e) parâmetro que possibilita prever o número de heterozigoto para as próximas gerações, assim sendo ambas medidas reportam-se à heterozigosidade senso da diversidade gênica de Nei (1987), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), desequilíbrio de ligação e coeficiente de endogamia (F_{IS}) que estima a deficiência de heterozigoto dentro da população, foram calculados. Este último foi estimado pelo seu análogo θ (Weir e Cockerham, 1984). Os níveis críticos de significância encontrados para o desequilíbrio de ligação foram corrigidos pelo método de Bonferroni, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, para $P_1 \leq \alpha/k$, onde k é o número de combinações entre os marcadores (Rice, 1989).

A presença de alelos nulos, erros de genotipagem, presença de picos stutter foram testadas através do programa Micro-Checker (2.2.3) (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

O coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) entre populações e sua significância por análise molecular de variância (AMOVA) foram avaliadas usando-se o programa Arlequin 3.01 (Schneider *et al.*, 2000). A estrutura genética de *M. carcinus* também foi investigada utilizando o programa Structure 2.3.3 (Prichard *et al.*, 2000) baseada nos genótipos dos indivíduos das quatro populações. Em seguida, com os dados obtidos pelo programa, calculou-se o K , $P(D) = L(K)$.

O número efetivo populacional que é uma medida da capacidade da população em manter sua variabilidade genética foi estimado com base no excesso de heterozigoto e no desequilíbrio de ligação utilizando o programa Ne Estimator e LDNE (Waples e Do, 2008).

4.5 Estudos bioecológicos

A fim de se determinar a provável época de recrutamento e, portanto a melhor época para a liberação de pós-larvas, análises bioecológicas foram conduzidas. Os camarões coletados foram identificados através do estereomicroscópio, considerando as chaves de Holthuis (1952) e Melo (2003). Posteriormente à identificação, os espécimes foram contados, sexados pela presença do apêndice masculino, ou ausência deste nas fêmeas, quantificados; medidos com paquímetro digital de precisão (0,1 mm) para o comprimento total (CT): distância entre a margem distal do rostro até a extremidade distal do telson. Em seguida pesados individualmente (camarão fixado) com o auxílio de uma balança digital eletrônica com precisão de 0,1 grama.

A presença de fêmeas ovígeras foi constatada através da presença de ovos presos aos pleópodos na região abdominal. Para os estudos de alimentação, foram retirados estômagos de 15 camarões por coleta, e estimados o grau de repleção gástrica (em %) através da transparência da parede do estômago, sob estereomicroscópio. Após esse procedimento, os estômagos foram colocados em placa de Petri e abertos para a análise. Os itens alimentares foram identificados até o menor nível taxonômico possível.

As amostras foram coradas com rosa de bengala, pelo menos, por 48 horas, com intuito de distinguir os tecidos dos animais amorfos e detritos vegetais. Os itens encontrados nos estômagos foram reunidos em categorias descritas abaixo:

- **MOA** (Matéria Orgânica Animal): todo material de origem animal cujo estado de digestão não permitiu a identificação.
- **MOV** (Matéria Orgânica Vegetal): todo material de origem vegetal cujo estado de digestão não permitiu a identificação.
- **Macrófita**: vegetais aquáticos que ocorrem desde áreas de brejos até ambientes verdadeiramente aquáticos.
- **Isca**: pedaços de coco
- **Mollusca**: representado por fragmentos de conchas ou pela concha inteira de

gastrópodes e bivalves.

- **Crustacea:** por fragmentos do corpo, de apêndices, cutícula.
- **Areia:** como pode ser ingerida acidentalmente, como consequência do hábito alimentar do animal, esta foi quantificada visto que em alguns casos ocupou um volume considerável.

5. Resultados

5.1 Análise Genética

Foram testados 42 *loci* que amplificaram diferentes regiões de microssatélite contendo 14 repetições dinucleotídicas, cinco trinucleotídicas, 18 tetranucleotídicas e cinco di e tetranucleotídicas. Os 42 loci foram inicialmente visualizados em géis de agarose, mas apenas 25 apresentaram perfis claros e definidos em géis de poli(acrilamida), sendo sete monomórficos e 18, polimórficos.

Os 18 *loci* polimórficos foram testados em quatro populações, mas apenas os loci Mcar03, Mcar05, Mcar09, Mcar13, Mcar15, Mcar18, Mcar19, Mcar23, Mcar25, Mcar31, Mcar 39 e Mcar46 apresentaram padrões claros e definidos para a separação dos alelos. Dez *loci* (Mcar03, Mcar05, Mcar09, Mcar13, Mcar15, Mcar19, Mcar23, Mcar25, Mcar39 e Mcar46) foram selecionados para serem testados em análise com o equipamento Genetic Analyzer 3500. O Mcar 23 foi analisado em gel de acrilamida por apresentar apenas dois alelos.

Nas análises por fluorocromos, os *loci* Mcar03, Mcar05, Mcar09, Mcar18 e Mcar19 não apresentaram picos bem definidos, sendo retirados das análises.

O número de alelos das quatro populações variou de dois a 18, com uma média de 10,33, sendo confirmado através da comparação dos resultados de eletroforese de acrilamida e pelos picos obtidos com os primers marcados no equipamento Genetic Analyzer. A análise mostrou que existem oito alelos privados, sendo três na população do Ceará, um em Pernambuco, dois em Alagoas/Sergipe e dois na população da Bahia (Tabela II). Todos os oito alelos foram considerados raros ($p < 0.05$).

A análise dos seis *loci* genotipados mostrou a presença de alelos nulos e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nas quatro populações para os *loci* Mcar 13, Mcar 15, Mcar46, como mostrado na Tabela III. Assim, estes foram retirados da análise.

As heterozigosidades esperadas, para os loci Mcar 23, Mcar 25, Mcar 39, apresentaram média de 0,6256. Já a média das heterozigosidades observadas foi de 0,5985.

Um programa de repovoamento deve preservar a variação genética da população de onde os reprodutores ou fundadores vieram (Lacy, 1994). Assim, o esforço em tais programas deve estar direcionado a minimizar a perda de variação genética entre os fundadores.

Diversos critérios são utilizados na escolha de fundadores de um programa de repovoamento baseados na importância genética. Um deles é o da “Singularidade Genômica” em que indivíduos que carregam alelos privados são classificados como altamente importantes (Ballou et al., 1995).

Tabela II – Tamanho dos alelos e suas frequências (entre parênteses) para cada *loci* analisado. Alelos raros das populações marcados em negrito.

Locus		Alelos										
Mcar 23												
População												
Ceará	169 (0.559)	173 (0.441)										
Pernambuco	169 (0.724)	173 (0.276)										
Alagoas/Sergipe	169 (0.688)	173 (0.312)										
Bahia	169 (0.663)	173 (0,337)										
Mcar 25												
População												
Ceará	191 (0.014)	199 (0.014)	-	-	-	221 (0.056)	-	231 (0.333)	233 (0.194)	235 (0.111)	237 (0.250)	239 (0.028)
Pernambuco	-	-	-	-	-	221 (0.044)	-	231 (0.397)	233 (0.191)	235 (0.103)	237 (0.250)	239 (0.015)
Alagoas/Sergipe	-	-	213 (0.013)	-	217 (0.013)	221 (0.066)	223 (0.026)	231 (0,355)	233 (0.184)	235 (0.092)	237 (0.184)	239 (0.066)
Bahia	-	-	-	215 (0.016)	217 (0.016)	221 (0.129)	-	231 (0,339)	233 (0.177)	235 (0.081)	237 (0.210)	239 (0.032)
Mcar 39												
População												
Ceará	194 (0.014)	-	210 (0.028)	212 (0.014)	214 (0.472)	-	218 (0.083)	222 (0.292)	-	226 (0.097)	-	-
Pernambuco	-	206 (0.015)	210 (0.015)	212 (0.015)	214 (0.382)	216 (0.029)	218 (0.044)	222 (0.324)	224 (0.029)	226 (0.147)	-	-
Alagoas/ Sergipe	-	-	210 (0.013)	212 (0.050)	214 (0.438)	-	218 (0.113)	222 (0.300)	224 (0.013)	226 (0.050)	230 (0.025)	-
Bahia	-	206 (0.015)	210 (0.045)	212 (0.030)	214 (0.379)	-	218 (0.045)	222 (0.333)	-	226 (0.121)	230 (0.015)	234 (0.015)

Tabela III : Variabilidade Genética da População *M. carcinus* do Ceará, Pernambuco, Alagoas/Sergipe, Bahia.

	CEARÁ	PERNAMBUCO	ALAGOAS/SERGIPE	BAHIA
Mcar 13				
N	36	34	40	33
A	12	14	14	18
He	0,8400	0,8638	0,9025	0,8903
Ho	0,8400	0,5882	0,7250	0,5454
HWE	*	*	*	*
NA	Sim	Sim	Sim	Sim
Mcar 15				
A	17	12	16	14
He	0,8775	0,8788	0,7450	0,8336
Ho	0,6389	0,4412	0,5250	0,4545
HWE	*	*	*	*
NA	Sim	Sim	Sim	Sim
Mcar 23				
A	2	2	2	2
He	0,4726	0,3468	0,4351	0,3573
Ho	0,6667	0,2941	0,4250	0,3030
HWE	NS	NS	NS	NS
NA	Não	Não	Não	Não
Mcar 25				
A	8	6	9	8
He	0,7829	0,7414	0,7583	0,7496
Ho	0,8056	0,7647	0,6750	0,7879
HWE	NS	NS	NS	NS
NA	Não	Não	Não	Não
Mcar 39				
A	7	9	8	9
He	0,6839	0,7340	0,7089	0,7361
Ho	0,5833	0,5294	0,6500	0,6970
HWE	NS	NS	NS	NS
NA	Não	Sim	Não	Não
Mcar 46				
A	17	15	15	12
He	0,9139	0,9091	0,8127	0,8848
Ho	0,7778	0,5882	0,5750	0,6667
HWE	NS	*	*	NS
NA	Sim	Sim	Sim	Sim

N = Número de indivíduos coletados; A = Números de alelos; He = Heterozigosidade esperada; Ho = Heterozigosidade observada; HWE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; NA = Alelos Nulos; * desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) médio para as populações estudadas foi de 0,0408, considerando apenas os três *loci* que não apresentam alelos nulos.

Quanto ao desequilíbrio de ligação, não foram detectados *loci* ligados ($P > 0,05$), e portanto, os três aqui descritos têm capacidade discriminatória em estudos de populações.

O valor total de F_{ST} foi de 0 com valores par a par próximos a este valor (Tabela IV). A estruturação genética populacional obtida pelo programa Structure mostrou um único grupo (Figura 12).

Utilizando o programa Arlequin 3.01 não foi possível calcular a significância por análise molecular de variância (AMOVA) por se tratar nas quatro populações de um único grupo.

Tabela IV - Valores do F_{ST} par a par das populações de *Macrobrachium carcinus*.

	Pernambuco	Ceará	Bahia	Alagoas
Pernambuco	-			
Ceará	-0,00626	-		
Bahia	-0,00860	-0,00583	-	
Alagoas	-0,00153	-0,00831	-0,00480	-

* $P < 0,05$

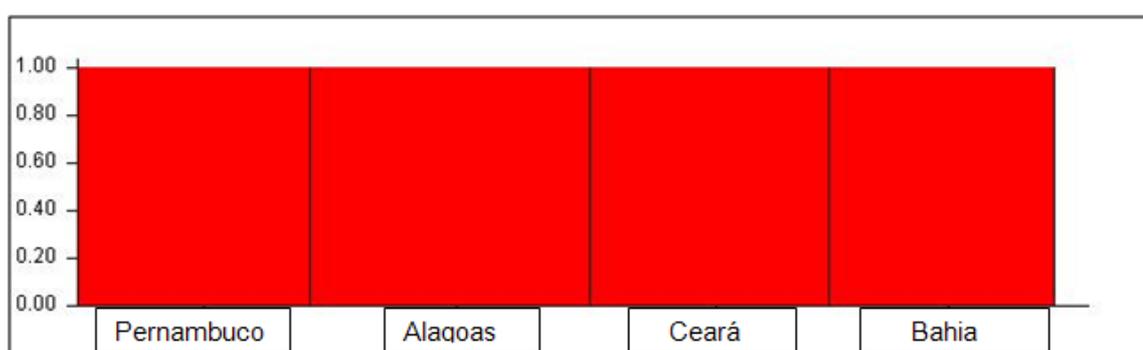


Figura 12: Resultado da estruturação populacional fornecida pelo Structure 2.3.3

O número efetivo populacional observado para as populações foi considerado infinito para todas elas segundo o método do excesso de heterozigotos. Entretanto, considerando o método do desequilíbrio de ligação, apenas as populações de Alagoas/Sergipe e Pernambuco, mantiveram-se como tal, enquanto nas populações

do Ceará e da Bahia, os valores oscilaram entre 58 e infinito e entre 19,1 e 130 indivíduos, respectivamente (Tabela V).

Tabela V – Número efetivo populacional (N_e) das populações de *Macrobrachium carcinus*

População	N_e - heterozigoto excesso ¹			N_e – desequilíbrio de ligação ²			
	N_e	95% IC Inferior	95% IC Superior	Menor Freq. Alélica Usada	N_e	95% IC Inferior	95% IC Superior
Alagoas/ Sergipe	∞	86.8	∞	0,05	∞	17.5	∞
				0,02	∞	108.4	∞
				0,01	∞	57.5	∞
Bahia	∞	29.7	∞	0,05	19.1	5.7	140.2
				0,02	61.8	18.8	∞
				0,01	130.0	29.3	∞
Ceará	∞	19.9	∞	0,05	58.2	6.3	∞
				0,02	63.9	9.3	∞
				0,01	∞	21.0	∞
Pernambuco	∞	23.7	∞	0,05	∞	5.7	∞
				0,02	∞	13.6	∞
				0,01	∞	22.0	∞

Fontes: ¹NeEstimator; ²LDNE

5.2 Análise bioecológica

Foram analisados 917 camarões provenientes das três localidades no baixo Rio São Francisco: Pão de Açúcar, Propriá e Piaçabuçu. Desses, 881 pertenceram à espécie *M. carcinus*, 35 à *M. acanthurus* e um indivíduo apenas à *M. olfersii* (WIEGMANN, 1836).

O número de indivíduos da espécie *M. carcinus* variou de 140 em junho/2009 a 181 em junho/2010, sendo a coleta do mês de abril/2010 a que apresentou menor quantidade de camarões. Ressalta-se, entretanto, que para o mês de outubro/2009 foi computada apenas a amostra proveniente de Propriá (n = 42) (Figura 13).

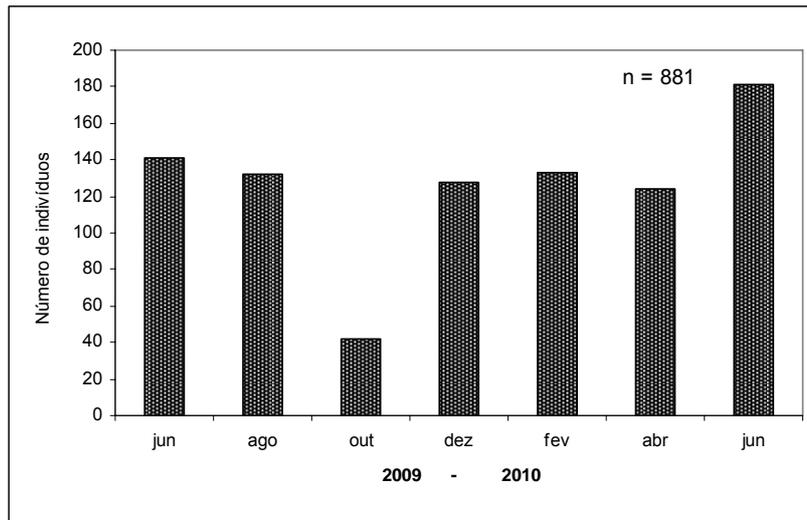


Figura 13: Variação do número de indivíduos de *Macrobrachium carcinus* coletados no baixo São Francisco de junho/2009 a junho/2010.

Com relação à distribuição por sexo, o número de fêmeas foi superior ao de machos durante quase o período (Figura 14).

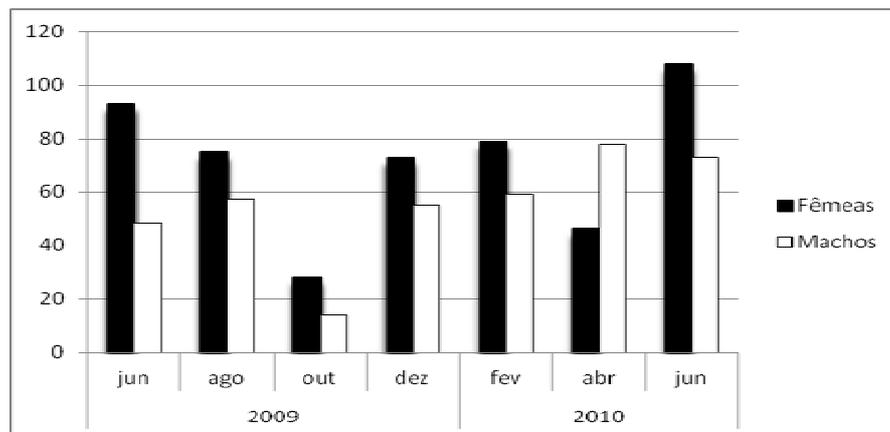


Figura 14: Variação no número de machos e fêmeas de *M. carcinus* coletados de junho/2009 a junho/2010

Com relação às fêmeas ovíferas, foram coletados 49 exemplares, sendo 19 em Penedinho, 17 em Pão de Açúcar e 13 em Propriá. O mês de fevereiro/2010 foi o que apresentou maior quantidade de fêmeas ovíferas (Figura 15).

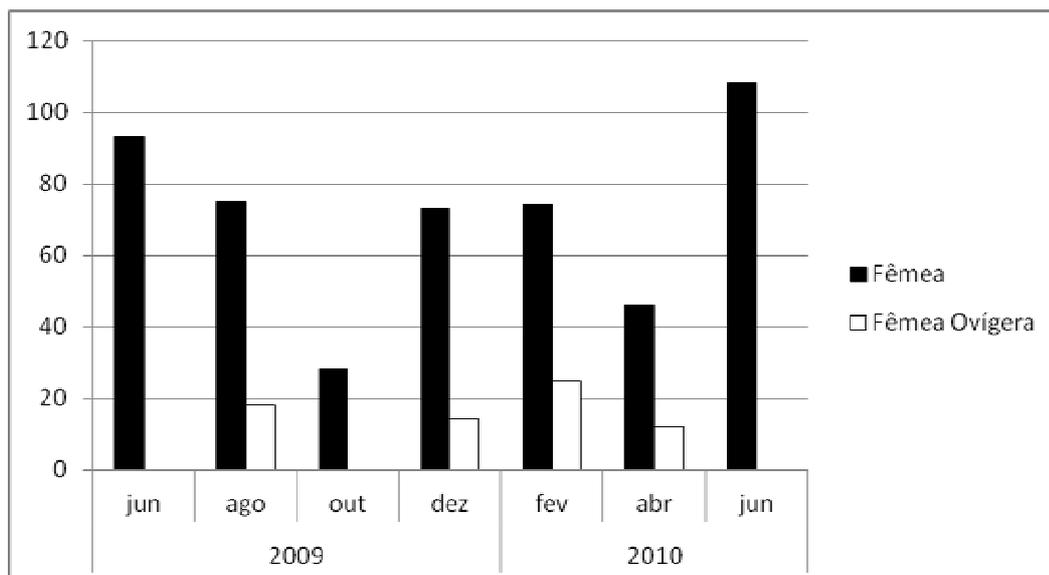


Figura 15: Relação entre o número de fêmeas e fêmeas ovígeras no período de junho/2009 a junho/2010

A maior fêmea ovígera apresentou 153,2 mm CT em fevereiro/2010, em Pão de Açúcar, e a menor 68,0 mm CT em abril/2010, em Penedinho.

Com relação ao tamanho dos exemplares, ao longo do rio São Francisco, o comprimento total dos machos variou de 51,1 mm em junho/2009 a 179,7 mm em agosto/2009. Para as fêmeas, o tamanho variou de 51,4 mm em junho/2009 a 173,7 mm em agosto/2009. De uma maneira geral, as médias dos camarões foram menores em junho/2009 e seguiram aumentando até fevereiro/2010, voltando a decrescer em abril e junho de 2010.

A relação peso-comprimento de *M. carcinus*, onde o peso é a variável dependente (y) e o comprimento, a variável independente (x) apresentou o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,81$ para fêmeas, e $R^2 = 0,83$ para machos (Figuras 16).

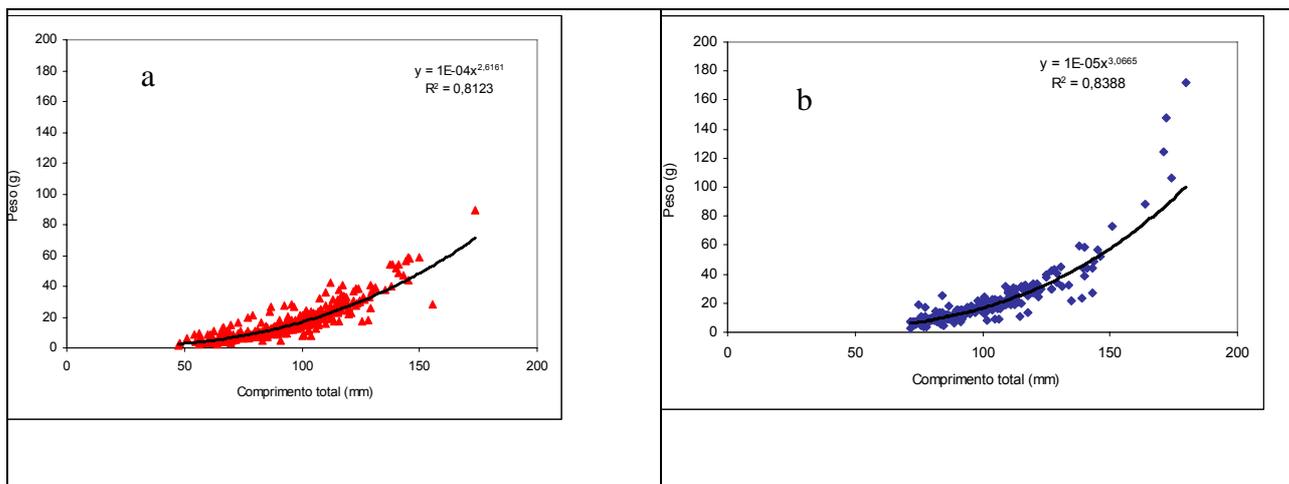


Figura 16:: Relação peso-comprimento de *Macrobrachium carcinus* coletadas no Rio São Francisco a) fêmeas; b) machos.

Com relação à alimentação dos camarões, um total de 90 estômagos foi analisado, com 79 cheios (87,8%) e 11(12,2%), vazios.

A repleção estomacal dos camarões coletados nas três localidades variou de 0 a 100%. A maioria dos estômagos analisados (n= 34) esteve dentro da classe de 0 a 20%; 12 estiveram na classe de 21 a 40%, 19 na classe de 41 a 60%, 14 na classe de 61 a 80% e, 11 estômagos estiveram presentes na classe de 81 a 100% (Figura 17).

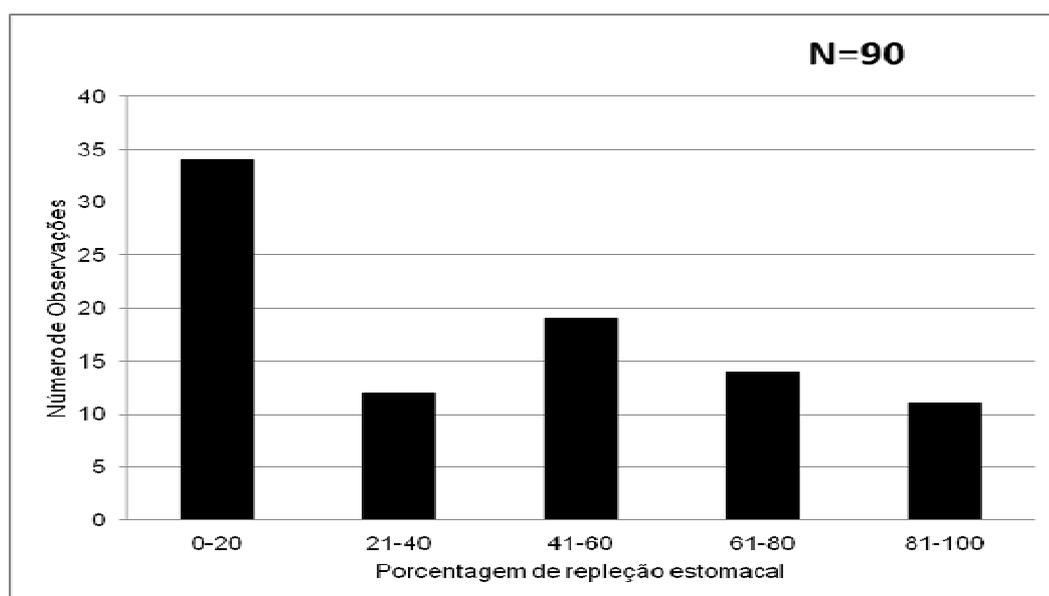


Figura 17: Distribuição de frequência da percentagem da repleção estomacal de *Macrobrachium carcinus* coletados no Rio São Francisco, de junho/2009 a junho/2010.

Com relação à composição da dieta, o espectro alimentar de *M. carcinus* apresentou-se diversificado preferencialmente com alimentos de origem vegetal,

incluindo macrófitas, alga filamentosa, isca (coco) e matéria orgânica vegetal (MOV) não identificada. Os itens de origem animal foram representados por camarões, moluscos gastrópodos e bivalves.

Restos de animais e vegetais (MOV e MOA) apresentando alto grau de digestão foram encontrados em 12,82% e 12,80%, respectivamente, dos estômagos analisados, não permitindo uma identificação mais acurada. (Figura 18).

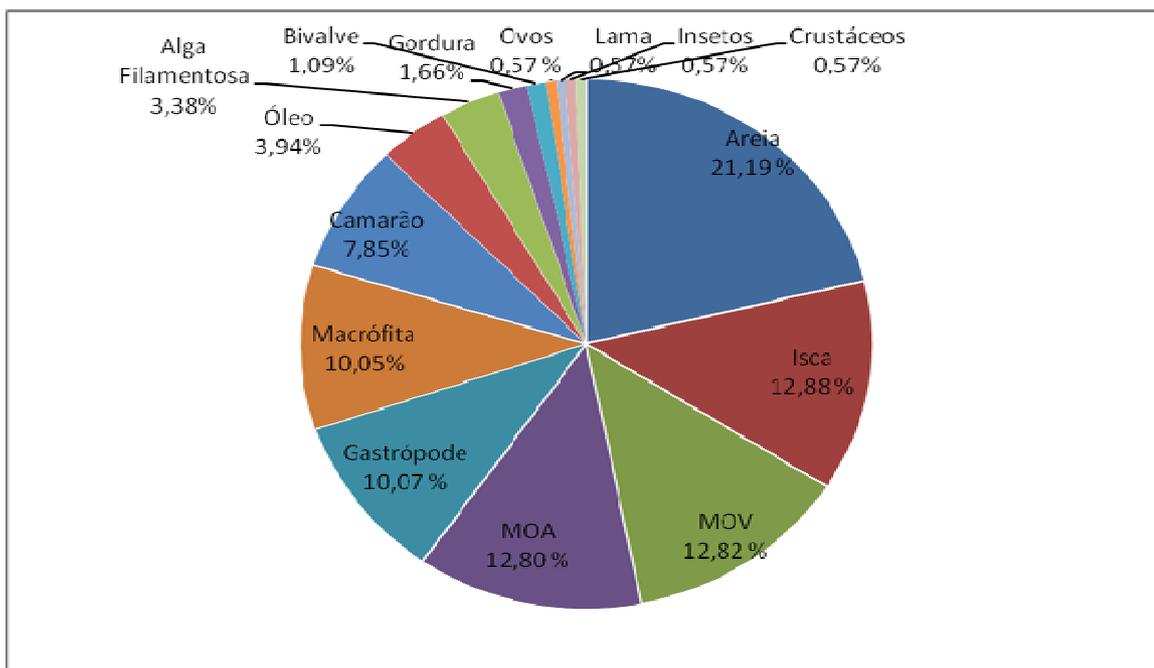


Figura 18: Frequência dos itens encontrados nos estômagos de *Macrobrachium carcinus* coletados no Rio São Francisco de junho/2009 a junho/2010. MOV = matéria orgânica vegetal não identificada, MOA = matéria orgânica animal não identificada.

A Figura 19 mostra a variação mensal da porcentagem dos itens encontrados nos estômagos de *M. carcinus*. É possível observar que os itens de origem vegetal predominaram principalmente nos meses de dezembro/2009 e fevereiro/2010.

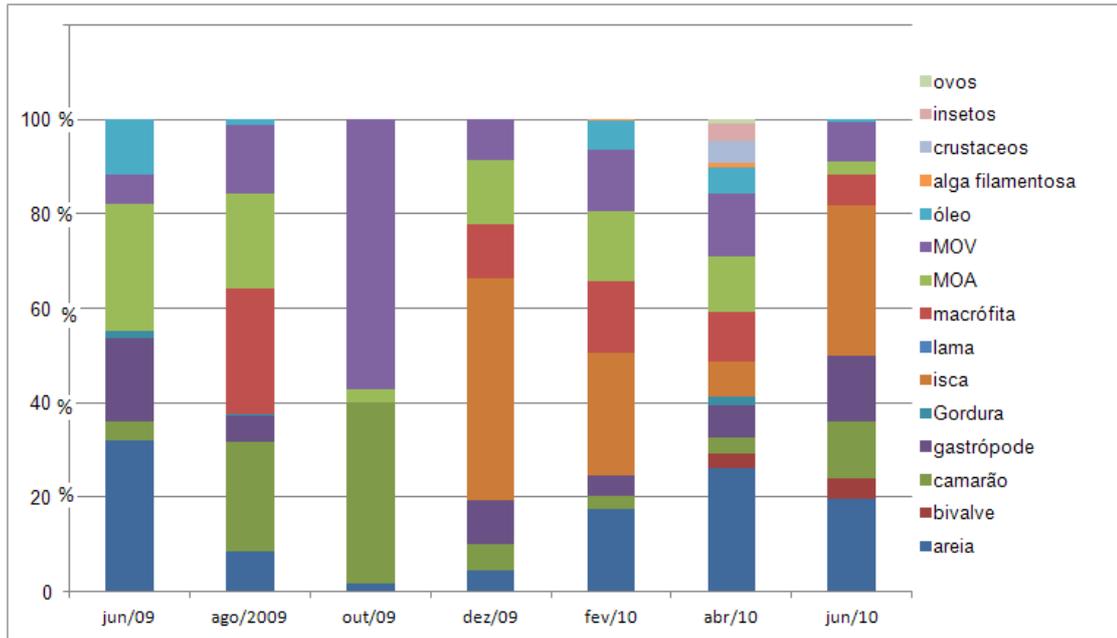


Figura 19: Porcentagem mensal dos itens encontrados nos estômagos de *Macrobrachium carcinus* coletados no Rio São Francisco, de junho/2009 a junho/2010. MOV = matéria orgânica vegetal não identificada, MOA = matéria orgânica animal não identificada

6. Discussão

Os primers utilizados no presente estudo representam os primeiros marcadores moleculares de microssatélites para *M. carcinus* e como tal não é possível comparar a diversidade com estudos prévios. Todavia, o número de alelos aqui relatado é similar aos encontrados para outras espécies do mesmo gênero na literatura (Quiao et al., 2011; Ma et al., 2010; Zhao et al., 2010; Karaket et al., 2010; Feng, 2010; Feng e Li, 2008; Khushiramani et al., 2008; Charoentawee et al., 2006; Chand et al 2005).

Segundo Lacth et al (2006), programas baseados em análises de agrupamento Bayesianas não são capazes de identificar corretamente o “k” quando se tem um $F_{ST} < 0,05$. A presença de oito alelos privados em frequências muito baixas indica que estes estão sob o risco de extinção e devem ser considerados na escolha de fundadores em um programa de repovoamento.

Três *loci* apresentaram alelos nulos de maneira sistemática nas quatro populações e foram retirados da análise, a fim de evitar o comprometimento das análises (Karaket e Poompuang, 2012). Os alelos nulos aparecem em decorrência de mutações no sítio de anelamento dos *primers*, e podem induzir a interpretações errôneas nos dados analisados (Van Oosterhout et al., 2004).

As populações do Ceará, Pernambuco, divisa de Alagoas/Sergipe e Bahia compartilharam a maior parte dos alelos entre si, apesar de pertencerem a três bacias hidrográficas, Atlântico Nordeste Oriental, São Francisco e Atlântico Leste. Este fato provavelmente ocorre devido à origem geológica das três bacias. Elas foram originadas nos domínios geológicos da Província Borborema (UFPE/Serviço Geológico do Brasil, 2008). O baixo F_{ST} encontrado e a ausência de estruturação sugerem um baixo nível de diferenciação, que pode ser explicado pelo fato da espécie se reproduzir em estuários e suas larvas serem dispersas para outros estuários. Resultados similares foram encontrados para outro camarão de água doce, *Macrobrachium lar*, que habita regiões marinhas durante as fases larvais (Hunter, 2011), utilizando três loci de microssatélites. Por outro lado, duas espécies australianas do gênero *Macrobrachium* que têm o ciclo completo em água doce, *M. australiense* e *M. asperulum*, apresentam estruturação genética com base em estudos baseados em genes mitocondriais (Cook et al., 2002; Carini e Hughes,

2004; Sharma e Hughes, 2009; Liu et al., 2011). A diferenciação genética em organismos aquáticos é maior entre espécies dulcícolas, seguido de espécies marinhas, enquanto as espécies estuarinas mostram um grau de diferenciação intermediário (Sharma e Hughes, 2009).

A alta similaridade genética entre as quatro populações avaliadas é vantajosa porque um único programa de repovoamento no Nordeste poderia suprir pós-larvas para as três bacias avaliadas, facilitando a logística e diminuindo os custos operacionais. O N_e estimado para as populações de acordo com o método do excesso de heterozigotos é próximo ao infinito em todos os casos. Contudo, segundo o método do desequilíbrio de ligação, as populações do Ceará e da Bahia estariam mais vulneráveis com números inferiores a 130. A regra clássica de conservação “50/500”, sugere que um N_e de 50 deixa a população vulnerável a efeitos imediatos da consanguinidade (Allendorf e Rieman, 2001). O N_e estimado por este método para as populações da Bahia e do Ceará, as coloca em risco potencial de extinção causada pelo aumento da taxa de endogamia que induz a uma perda de variabilidade genética.

Sob a ótica de que um programa de repovoamento venha se concretizar liberando pós-larvas na região do baixo São Francisco, deve-se considerar que o pico reprodutivo mais provável para esta espécie ocorra em fevereiro, com pós-larvas disponíveis no ambiente por volta de 90 dias, segundo observações experimentais (Graziane et al., 1993, Valenti, 1985, Herman et al., 1999, Pinheiro et al., 2004; Santos et al., 2007), portanto o recrutamento teria seu pico no mês de maio.

O maior número de fêmeas durante todo o período de coleta pode ser justificado pelo hábito territorialista do *M. carcinus* descrito por Coelho et al., 1982; Lewis et al., 1996 ;Kutty e Valenti, 2010). Além disso, de um modo geral, o tamanho médio das fêmeas coletadas mostrou-se ligeiramente maior do que o dos machos. A fecundidade de *M. carcinus* é proporcional ao tamanho da fêmea, sendo uma condição essencial à maioria das espécies de carídeos, que carrega seus ovos aderidos aos apêndices abdominais restringindo-os em tamanho e número de acordo com o espaço disponível para a fixação (Lara e Wehrtmann, 2009). Esta condição de carídeos também explicaria o coeficiente de alometria encontrado nas relações peso x comprimento encontradas para cada sexo. Machos apresentaram

coeficiente aproximadamente igual a três (3,0) e, portanto, um crescimento isométrico. Já as fêmeas apresentaram um crescimento alométrico negativo ($< 3,0$), ou seja, o ganho em crescimento é maior do que o ganho em peso (Fonteles Filho, 1989).

O menor número de indivíduos coletados no mês de abril pode estar relacionado a uma suposta migração reprodutiva. Segundo Coelho (1982) e Herman et al., (1989), esta espécie precisa de água com salinidade de 16 ppt para completar seu desenvolvimento larval. Assim, adultos migrariam para a foz do rio São Francisco, cerca de 150 km, a fim de encontrar águas estuarinas. A utilização de redes zooplanctônicas possibilitaria a coleta de pós-larvas e verificar a ocorrência delas próximas aos estuários da foz.

No que diz respeito à alimentação, dentre os itens encontrados no conteúdo estomacal, destacaram-se os de origem vegetal como pedaços de macrófitas, algas filamentosas e isca (coco), mas também restos de camarões e moluscos. Segundo Queiroz et al., (2007), o *M. carcinus* possui hábito noturno e é predominantemente detritívoro, alimentando-se de restos de animais e vegetais. Podem comer organismos vivos, como algas, larvas de insetos e moluscos ou outros crustáceos. Para Leber, 1985, estes camarões são os principais predadores de macrófitas aquáticas, além de incluírem em sua dieta microcrustáceos, moluscos e poliquetas. A abundância de um determinado item na dieta deve refletir a preferência da espécie (Fonteles Filho, 1989), mas também uma maior disponibilidade deste no ambiente (Fonteles Filho, 1989; Cortés e Criales, 1989/1990). Assim, um programa de repovoamento na região deverá considerar também a disponibilidade de macrófitas no ambiente.

7. Conclusões

- 1) Os dados aqui obtidos mostraram que as quatro populações oriundas de três diferentes bacias hidrográficas não apresentaram distinção genética. O alto fluxo gênico é de extrema relevância, considerando que um único programa de repovoamento poderia suprir pós-larvas para todos os rios da região.
- 2) A presença de alelos raros torna imprescindível que reprodutores de diversas populações sejam utilizados como fundadores a fim de evitar a perda definitiva destes alelos em ações de repovoamento.
- 3) A ocorrência do pico reprodutivo em fevereiro para esta espécie mostra que o mês de maio corresponde à provável época de repovoamento.
- 4) A utilização de redes zooplanctônicas permitiriam a captura de camarões de tamanhos menores e confirmar a época de recrutamento e hábitos alimentares em menores classes de comprimento da espécie. Estas informações são essenciais para determinação da melhor época e local para se proceder à soltura de pós-larvas.

8. Referências

Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC-
<http://www.abccam.com.br/abcc/>. Acesso em 15 de março 2012.

Allendorf, F.W. ; Ryman, N. (1987) Genetic management of hatchery stocks. N. Ryman, F. Utter (Eds.), Population Genetics and Fishery Management, University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 141–159

Alvarez, I.; Royo, L. J.; Fernandez, I.; Gutierrez, J. P.; Gomez, E.; Goyache, F. (2004) Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *Journal of Animal Science*, v. 82, n. 8, p. 2246-52, 2.

Alvarez, L.; Gutierrez-Gil, B.; San Primitivo, F.; De La Fuente, L. F.; Arranz, J. J.(2006) Influence of prion protein genotypes on milk production traits in Spanish Churra sheep. *Journal Dairy Science*, v. 89, n. 5, p. 1784-91.

Arraki e Schimid ,(2010). Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture* 308 S2-S11.

Arranz J J, Bayon Y and San Primitivo F (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Animal Genetics* 29: 435-440.

Arranz, J. J ; Bayon , Y; San Primitivo, F. (2001). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genetic Selection and Evolution* v.33, n 5, p 529-542.

Barros, M. P. e L. M. A. Silva. (1997). Registro da introdução da espécie exótica *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae, em águas do estado do Pará, Brasil.13, Pará, *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*.

Barrilet, F.; Arranz, J. J.; Carta, A. (2005). Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Genetics Selection Evolution*, v. 37, p. S109–S123 S109.

Beiguelman, B. (2008) *Genética de Populações Humanas*. Ribeirão Preto: SBG. 235p.

Bhat, S; Patel, A ; Das , P; Meher , P. K ; Pillai, B. R. ; Jayasankar , P. (2009). Isolation and characterization of microsatellite loci in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* *Conserv Genet* ,10:1473–1475

Brasil A, 2010. Agência Nacional das Águas - ANA. Brasília. Disponível em: <http://www.ana.gov.br>. Acesso em 20 de fevereiro 2012.

Brasil B, (2010). Disponível em: <http://www.saofrancisco.cbh.gov.br/baciasf.aspx>, acesso em 4 de abril de 2012.

Bueno, S. L. S.; S. S. Rocha; I. C. Arantes; F. Kiyohara; H. L. M. Silva; E. C. Mossolin; G. A. S. Melo; C. Magalhães e G. Bondbuckup. (2001). Freshwater decapod diversity in the State of Sao Paulo, Brazil. *In: Fifth International Crustacean Congress, Abstracts, 9–13*. The University of Melbourne, Melbourne, Australia, p. 47.

Brown, A. H. D. (1978) Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 52, n. 4, p. 145- 157.

Brown, J. H; New M. B; Ismael , D (2010) Culture of other freshwater prawn species. In: New, M.B., Valentl, W.C., Tidwell, J.H., D'abramo, L.R. & Kutty, M.N. (Eds.). *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, England. 19 pp.

Carini, G., and Hughes, J. M. (2004). Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda : Palaemonidae) in western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes. *Heredity* **93**, 350–363.

Cavalcanti, L.B.; Correia, E.S. e Cordeiro, E.A. Camarão: manual de cultivo do *Macrobrachium rosenbergi* (pitu havaiano–gigante da Malásia). Aquaconsult, 143 p., Recife, 1986.

Cavalcanti L.B (1998) Histórico. In: Valenti WC (ed), Carcinicultura de Água Doce. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e do Recursos Naturais Renováveis, Brasília, pp 17–20

Chand, V; De Bruyn, M ; Mather. P. B.(2005) Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Molecular Ecology Notes, 5, 308–310

Chambers, G. K. e Macavoy, E. S., (2000); Microsatellite: consensus and controversy, Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126: 455-476.

Chareontawee, K., Poopuang, S., Na-Nakorn, U.,(2006). Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Molecular Ecology Notes 6, 823–825

Choudhury, P. C (1969). Complete larval development of the palaemonid shrimp *Macrobrachium carcinus* (L.) reared in the laboratory (Decapoda, Palaemonidae). International Journal of Crustacean Research. Vol 20, p 51.

Cintra, I.H.A, Silva, K.C.A, Muniz, A.P.M. (2003) Ocorrência de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) em áreas estuarinas do estado do Pará (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) Bol. Téc. Cient. CEPNOR, Belém, v.3, n.1, p. 219-227.

Coelho, P. A.; Ramos-Porto, M.; Soares, C. M. A. Biologia e cultivo de camarões de água doce. Universidade Federal de Pernambuco, 53 p., Recife, 1982.

Coltman, D. W.; Wilson, K.; Pilkington, J. G.; Stear, M. J.; Pemberton, J. M. (2001) A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with

resistance to 38 gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology*, v. 122, p. 571-582.

Cook, B. D; Bunn S. E.; H. J. M. (2002) Genetic structure and dispersal of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in western Queensland, Australia. *Freshwater Biology* (2002) 47, 2098–2112.

Cortés, M.L., Ciales, M.M. (1989/1990) Analisis del contenido estomacal del camaron titi *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) (Crustacea: Natantia: Penaeidae). *Annals del Instituto de Investigations Marinas*, v.19-20, p. 23-33.

Cowx, I. G. stocking strategies. *Fisheries Management and Ecology*. Oxford, v. 1, no 1, p.15-20, Apr. 1994.

Denise, S.; Johnston, E.; Halverson, J.; Marshall, K.; Rosenfeld, D.; Mckenna, S.; Sharp, T.; Edwards, J.(2003) Power of exclusion for parentage verification and 39 probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics*, v. 35, p. 14- 17.

Diez-tascon, C.; Littlejohn, R. P.; Almeida, P. A.; Crawford, A. M. (2000) Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics*, v. 31, n. 4, p. 243-51.

Divu, D; I; Karunasagar, I Karunasagar, I.(2008) Microsatellite DNA markers in the giant freshwater prawn,*Macrobrachium rosenbergii*: a tool for genetic analysis. *Molecular Ecology Resources* **8**, 1040–1042

Excoffier, L. G. Laval, e S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Ellegren, Hans (2004), Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution, *Nature Reviews, Genetics*, 5: 435-445.

Eriksson, J; Siedel,H; Lukas,D; kayser, M;Erlar, A; Hashimoto, C; Hohomann, G; Boesch, C; Vigilant, L. (2006) Y-chromosome analysis confirms highly sex-biased dispersal and suggests a low male effective population size in bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, v.15, n.4, p. 939-949, apr.

Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.

FAO (1993) Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. FAO Fish. Rep. vol. 491, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Falconer, D. S.; Mackay, T. F. (1996). *Introdução à genética quantitativa*. Londres: Longman, 1996, 464 p.

Feng JB, Li JL (2008) Twelve polymorphic microsatellites in Oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Mol Ecol Resour* 8:986–988

Fievet, E. (1998) Distribution et capacités d'expansion des crevettes d'eau douce de la région caraibe: exemple des genres *Macrobrachium* et *Atya* (Crustacea: Caridae). *Biogeographica* 74: 1-22.

Fonteles-Filho, A.A. (1989) Recursos pesqueiros biologia e dinâmica populacional. Imprensa Oficial do Ceará. Fortaleza, 296p.

Foissac, A.; Fort, M.L.; Giraldo, P.; Abbal, M.; Rafloux, C.; Cambonthomsen. (1997) A. Microsatellites in the HLA region: Potential applications in bone marrow transplantation. *Immunological Reviews*, New York, v. 29, p.2374-2375.

Goldstein, D. B. ; Schlötterer, C, (1999), *Microsatellites : Evolution and applications*, Oxford University Press

Garrigan, D; Hammer, M. F. (2006) Reconstructing human origins in the genomic era. *Nature Reviews Genetics*, v.7, p. 669-690.

Graziani, C.A., Chung, K.S.; Donato, M. (1993) Comportamiento reproductivo y fertilidad *Macrobrachium carcinus* (Decapoda: Palaemonidae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 41(3-A):657–65.

Guerra, A. L.; Lima, A. V. B.; Taddei, F. G.; Castiglioni, L.(2010) Genetic polymorphism, molecular characterization and relatedness of *Macrobrachium* species (Palaemonidae) based on RAPD-PCR. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 2317- 2327.

Hancock, J.M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms, p.1-9. In D.B. Goldstein & C. Schlötterer (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, 368p

Herman, F., Boucher, P. e Fievet, E. (1999) Potentialités et intérêts de l'élevage larvaire de la crevette d'eau douce indigène *Macrobrachium carcinus* (L.) (Palaemonidae) aux Antilles Françaises. *Bulletin Français de la Pêche et de la Protection des Milieux Aquatiques Tropicaux* 352:81–90.

Holthuis, L.B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Américas II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation*, 12: 1-396.

Holthuis, L.B. (1980). Shrimps and prawns of the world. An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. *FAO species catalogue*. Vol.1 *FAO Fisheries Synopsis*, Roma, v.1, n.125,271p.

Holthuis, L. B. (1993). The recent genera of the Caridean and Stenopodidean shrimp (Crustacea, Decapoda): with an appendix on the order Amphionidacea. *Leiden: Nationaal Natuurhistorisch Museum*, 328 p.

Hunter, B. E (2011). Population Genetic Structure and Patterns of Dispersal in the Giant Long- Armed Prawn, *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1798)(Decapoda: Palaemonidae). School of Biogeoscience. Queensland University of Technology. Tese.

Ingram B. A.; Hayes B.; Rourke M. L (2011) Impacts of stock enhancement strategies on the effective population size of Murray cod, *Maccullochella peelii*, a threatened Australian fish. *Fisheries Management and Ecology*.18, p.467.

Jalihal, D.R.; Sankolli, K.N. e Shenoy S. (1993). Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, Leiden, 65 (3): 365-376.

Karaket, T ; Poompuang, S. (2012) CERVUS vs. COLONY for successful parentage and sibship determinations in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man *Aquaculture* 324–325, 307–311.

Kageyama, P. Y. (1987) Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. *Silvicultura*, São Paulo, v. 11, n. 41, p. 7-37.

Kutty, M.N. e Valenti, W.C. (2010). Culture of other freshwater prawn species. *In*: New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D’abramo, L.R. & Kutty, M.N. (Eds.). *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, England.560 pp.

Lara, L.R e Wehrtmann, I. (2009) Reproductive Biology of the Freshwater Shrimp *Macrobrachium Carcinus* (L.) (Decapoda: Palaemonidae) From Costa Rica, Central America.) *Journal Of Crustacean Biology*, 29(3): 343-349.

Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A. e Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11, 2453–2465,2002.

Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401

Lorezen, Kai. (2011) Quantitative Approches to evaluating the contribution of release programs to fisheries Management goals. Book of abstracts for oral and pôster apresentações. The 4 international symposium on stock enhancement and sea ranching.

Ma, K. Y ; Feng, J. B. ; Li, J. L; Ding, H. Y. (2010) Twenty-four novel polymorphic microsatellite markers from oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) *Conservation Genet Resour* 2:125-128

Mather , P. B; De Bruyn, M. (2003) Genetic diversity in wild stocks of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Implications for aquaculture and conservation. *NAGA, World Fish Center Quarterly* Vol. 26 No. 4 Oct-Dec.

Mcrae, A. F.; Mcewan, J. C.; Dodds, K. G.; Wilson, T.; Crawford, A. M.; Slate, J. (2002.) Linkage disequilibrium in domestic sheep. *Genetics*, v. 160, n. 3, p. 1113-1122.

Magalhães, C.; Bond-Buckup, G.; De Melo, G.A.; Buckup, L. (2003) Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Gustavo Augusto S. de Melo (editor). Edição: Loyola: Centro Universitário São Camilo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.

Mantellato, F.L.M., Christofolletti, R.A. (2001) Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): influence of season, sex, size and moult stage. *Marine Biology*, v. 138, n. 3, p. 585-594.

Matioli, S. R.; Passos-Bueno, M. R. S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. *Biologia Molecular e Evolução*, Cap. 15. Editora Holos.

Melo, G.A.S. 2003. Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo, ed. Loyola, 429p.

Miller, L.M., Kapuscinski, A.R. (2003) Genetic guidelines for hatchery supplementation programs in E.M. Hallerman editor. Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries and Scientists. American Fisheries Society, Maryland.

Montenegro, S.C.S., Nordi, N. e Marques, J.G.W. (2001) Contexto cultural, ecológico e econômico da produção e ocupação de espaços de pesca pelos pescadores de pitu (*Macrobrachium carcinus*) em um trecho do baixo São Francisco, Alagoas-Brasil. Interciência 26(11):535–40.

Mossolin, E. C.; Bueno, S. L. Relative Growth of the second pereopod in *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836), (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana, v. 76,p. 363-376, 2003.

Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307.

Pereira, G.; Stefano, H.; Staton J.; Farrell, B. (2002) Phylogenetic relationships in some species of the genus *Macrobrachium* based on nucleotide sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase. Modern Approaches to the Study of Crustacea, New York, Kluwer Academics/Plenum Publishers, p. 319-322,

Pinheiro, S.M.X.; Façanha, S.C.; Abreu, V.V.B.;Mavignier, G.V.L. e Vieira, M.J.A.F. (2004) Acasalamento em cativeiro e processo de larvicultura do pitu *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758). In Anais do Aquacultura 2004, 24–28 May 2004, Vitória, p. 51.Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal.

Porto, L.A.C., Nascimento, V. (1998). Camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* no Centro-oeste Brasileiro e no Tocantins, Brasil. In: 50º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para progressoda Ciência, Natal, RN

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155:945–959.

Queiroz, J.A.C., Silva-Júnior, A.C.S., Trindade, P.A.A., Silva, R.S., Sá-Oliveira, J.C., Souto, R.N.P. (2007) Relação peso-comprimento do pitu *Macrobrachium carcinus* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) no estuário norte do Amazonas, Macapá, AP. In: Congresso De Ecologia Do Brasil, VIII, Anais. Caxambu, MG.

Qiao, H ;Li , F ; Fu, H; Wu, Y; Gong, Y; Jiang, S; Xiong, Y, Wang, N. (2011). Isolation and characterization of 40 microsatellite loci for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) and cross-species utility. *Conservation Genet Resour* . 3:319–322

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

Rice, W. R.(1989) Analyzing Tabbles of Statistical Tests. *Evolution* 43. p.223-225,.

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

Sampaio, S. R, Nagata,J.K, Lopes, O.L, Masunari, S. (2009) Camarões de águas continentais (Crustacea, Caridea) da Bacia do Atlântico oriental paranaense, com chave de identificação tabular. *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 38 (1-2): 11-34.

Santos, E.P; Leal, A.L.G; Silva, P.M.M; Correia, E.S. (2007) Influência de diferentes dietas na sobrevivência larval do camarão de água doce *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) . *Acta Sci. Biol. Sci. Maringa*, v. 29, n. 2, p. 121-124.

Santos, Teresa de Jesus Manríquez. (2009) Caracterizacion de Enzimas Digestias Y Digestibilidad in vitro em adultos de La Pigua *Macrobrachium carcinus*. Puerto Escondido, Oax, Enero 2009. Tese.

Satar, I. M. (2009) Caracterização de Microssatélites em Espécies de Ambientes Humanizados. Tese. Universidade de Lisboa Faculdade de ciências departamento de biologia animal.

Sharma, S ; Hughes, M. J. (2009) Genetic structure and phylogeography of freshwater shrimps (*Macrobrachium australiense* and *Macrobrachium tolmerum*): the role of contemporary and historical events. *Marine and Freshwater Research*, 60, 541–553

Schlötterer, C (2004), The evolution of molecular markers – Just a matter of fashion?, *Nature Reviews, Genetics*, 5: 63-69.

Schneider, D. S.; Roessli, L.; Excoffier, L. Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory/University of Geneva, 2000.

Selkoe, K.A, Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629

Short, J. W. (2004). A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda:Palaemonidae). *Hydrobiologia*, v. 525, p. 1-100.

Tapio, M.; Tapio, I.; Grislis, Z.; Holm, L. E.; Jeppsson, S.; Kantanen, J.; Miceikiene, I.; Olsaker, I.; Viinalass, H.; Eythorsdottir, E. (2005) Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 13, p. 3951-3963.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17, 6463–71.

Uzun, M.; Gutierrez-Gil, B.; Arranz, J. J.; San Primitivo, F.; Saatci, M.; Kaya, M.; Bayon, Y. (2006) Genetic relationships among Turkish sheep. *Genetics Selection Evolution*, v. 38, n. 5, p. 513-524.

Valência, D. M e Campos M. R (2007). Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate 1868 (Crustacea Decapoda : Palaemonidae) of Colombia Zootaxa 1456: 1-44

Valenti,W.C. (1985) *Cultivo de Camarões de Água Doce*. Nobel, São Paulo.

Valenti, W. C.; Mallasen, M.; Silva, C. A.(1998) Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In: Valenti, W. C. Carcinicultura de água doce. Brasília, DF: FAPESP, p. 115-144.

Valenti, W. C. ; J. T. C. Mello. e V. L. Lobão.(1989a). Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6 (1): 9-15.

Valenti, W. C. e V. L. Lobão. (1989b). Crescimento relativo de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6 (1):1- 8.

Valenti, W. C. e New, M. B. 2000. Grow-out systems - Monoculture. In: New, M.B. & Valenti, W. C. (Ed.) Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, Blackwell Science. p. 157-176

Valenti, W. C. 2002. Criação de camarões de água doce. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais. p. 229-237.

Van Oosterhout C, Hutchinson F, Wills D, Shipley P (2004) Micro- Checker: software for identifying and correcting genotype errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.

Zhao, Y; Wang, H ; Ji , X; Zeng, Y ; Yang, P; Ding, L.(2010) Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite markers in *Macrobrachium nipponense*. Conservation Genet Resour , 2:137–139

Yeoh, Y.; Kang, S. S.; Chung, M. G. (1996) Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. *Botanical Bulletin of Academia Sinica, Shanghai*, v. 37, n. 1, p. 141-146.

Waples, R.S., Do, C., 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8 (4), 753–756.

Withler, R.E., 1990. Genetic consequences of salmonid egg fertilization techniques. *Aquaculture* 85, 326.

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

Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, v. 38. n.6. p.1358-1370.

Wright, S. Evolution in mendelian populations. *Geneticis*, v. 16, p. 97-159, 1931.