

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**“MAPEAMENTO GENÉTICO NO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA,
DECAPODA)”**

Michelle Mantovani Gonçalves

São Carlos - SP

2009

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**“MAPEAMENTO GENÉTICO NO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA,
DECAPODA)”**

Doutoranda: Michelle Mantovani Gonçalves

Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior

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

São Carlos - SP

2009

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

G635mg

Gonçalves, Michelle Mantovani.

Mapeamento genético no camarão marinho *Litopenaeus Vannamei* (Crustacea, Decapoda) / Michelle Mantovani Gonçalves. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
70 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Genética e evolução. 2. Mapeamento genético. 3. Camarão. 4. Marcador molecular. 5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). I. Título.

CDD: 575 (20ª)

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

MAPEAMENTO GENÉTICO NO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*
(CRUSTACEA, DECAPODA)

Tese de Doutorado de Michelle Mantovani Gonçalves

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr

Profa. Dra. Silvia Nassif Del Lama

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Dr. Michel Choairy de Moraes



Handwritten signatures of the five members of the exam board, each written over a horizontal dotted line.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Joel Evaristo Gonçalves e a minha mãe Mariza Ap. Mantovani Gonçalves: por todo carinho, paciência e compreensão que tiveram comigo, ajudando-me a alcançar esse objetivo e a construir o meu futuro. Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus, pois tenho certeza que sem Ele eu não teria vencido mais esta etapa da minha vida.

Ao prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior, pela oportunidade de executar este trabalho, pela orientação, confiança, apoio, paciência e amizade.

A profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, por permitir o uso do seqüenciador automático em seu laboratório, por todas as conversas de grande importância para a realização deste trabalho, pela paciência e amizade.

Ao prof. Dr. Cosme Damião e seu aluno Caio Salgado, pela ajuda com o programa GQMOL durante a construção dos mapas de ligação.

Ao Dr. João Luís Rocha, amigo de todas as horas, boas e tristes. Obrigada pela paciência e por estar sempre presente nos momentos que mais precisei, auxiliando-me muitas vezes quando tive dúvidas ou dificuldades durante o desenvolvimento deste trabalho.

A profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas, pela imensa disposição em ajudar-me muitas e muitas vezes, sempre atenciosa em nossas conversas, discussões sobre o trabalho, pela amizade e pelo carinho de irmã.

A profa. Dra. Andrea Peripato, amiga querida sempre atenciosa e presente nos momentos que precisei com minhas dúvidas e pela paciência em me auxiliar em todos os momentos que precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, professores e ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos pelo auxílio na realização desse estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e reserva técnica para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A Aquatec Ltda responsável pela formação da população experimental utilizada neste estudo e principalmente Ana Carolina Guerrelhas e Ana Karina Guerrelhas por me receber na empresa durante os experimentos na Aquatec. A todos os funcionários da empresa pela atenção e carinho.

Ao Gustavo Gasparin, João José, Marcelo Cervini, Adriana Ibelli e Gisele Veneroni por me auxiliarem no seqüenciador automático, paciência, amizade e pela atenção de sempre.

Aos meus pais, Joel e Mariza, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em minhas decisões. Sem vocês, esse trabalho jamais seria realizado, aos meus irmãos Jaqueline e Rodrigo e a minha sobrinha que tanto amo Olívia.

Ao Rolando André pela colaboração na extração de DNA e quantificação.

A todos que passaram pelo laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética pela ajuda, atenção, amizade, carinho, paciência e momentos de descontração. Todos fazem parte desta conquista.

Aos amigos do Departamento de Genética e Evolução, obrigada pela amizade e carinho de sempre.

A todos que o nome não está aqui citado, mas que de alguma forma fizeram parte da realização deste trabalho.

Resumo

Dois mapas genéticos de ligação foram construídos referentes a duas famílias de irmãos completos (G1 e G2) da espécie de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e foi realizada a integração desses mapas. O mapeamento foi baseado em marcadores polimórficos derivados de nove primers AFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados). Um total de 103 e 59 marcadores polimórficos segregantes foram utilizados respectivamente para a construção dos mapas das famílias G1 e G2. O mapa da família G1 consistiu de 14 grupos de ligação, com cobertura estimada do genoma de aproximadamente 350 cM. O mapa da G2 apresentou 4 grupos de ligação, com cobertura do genoma de aproximadamente 300 cM. A integração dos mapas evidenciou 8 marcadores âncoras AFLP em um mesmo grupo de ligação (GL1) em ambas as famílias, no qual foram alocados 66 marcadores, o que conduz um grupo de ligação bem saturado, com estimativa de cobertura do genoma de 874,16 cM.

Abstract

Two genetic linkage maps were constructed referent to two full-sib families (G1 and G2) of the marine shrimp species *Litopenaeus vannamei*, and the integration of these maps was accomplished. The mapping was based on polymorphic markers derived from nine AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) primers. A total of 103 and 59 segregating polymorphic markers were used in the construction of the maps for families G1 and G2, respectively. The G1 family map consisted of 14 linkage groups, with estimated genome coverage of approximately 350 cM. The G2 map presented 4 linkage groups, with genome coverage of around 300 cM. The integration of the maps evidenced eight AFLP anchor markers in a same linkage group (LG1) in both families, to which 66 markers were allocated, leading to a well saturated linkage group, with estimated genome coverage of 874.16 cM.

Sumário

1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura	5
2.1. <i>Litopenaeus vannamei</i> e seu cultivo	5
2.2. Marcadores moleculares e a técnica de fAFLP	9
2.3. Mapeamento Genético	13
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Obtenção da geração segregante F2.....	21
3.2. Extração do DNA genômico.....	24
3.3. Quantificação do DNA em Espectrofotômetro.....	26
4. Resultados	35
4.1. Amplificação de DNA e obtenção do perfil de fAFLP	35
4.2. Mapa de ligação para família G1	36
4.3. Mapa de ligação para família G2	40
4.4. Integração dos mapas (famílias G1 e G2).....	43
5. Discussão	46
5.1. Mapa de ligação das famílias G1 e G2	46
5.2. Integração dos mapas das famílias G1 e G2	55
6. Conclusões	60
7. Referências Bibliográficas.....	62

Lista de Figuras

- Figura 1. Mapa genético de ligação do camarão marinho *L. vannamei* (família G01). Marcadores AFLP são mostrados no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado no lado esquerdo em cM Kosambi. 39**
- Figura 2. Mapa genético de ligação do camarão marinho *L.vannamei* (família G02). Marcadores AFLP são mostrados no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado no lado esquerdo em cM Kosambi. 42**
- Figura 3. Mapa integrado através de duas famílias, ilustrando a integração de dois grupos de ligação (GL1) referentes a famílias G1 e G2. Marcadores AFLP são mostrados no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado no lado esquerdo em cM Kosambi. 44**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Combinações de primers (EcoRI-MseI) testados com o fAFLP. As combinações de primers em negrito foram escolhidas e utilizadas nos parentais e na população segregante F2..... 31

Tabela 2. Combinações de primers AFLP utilizadas nas ampliações de PCR, nomenclatura utilizada nos mapas de ligação e número de locos polimórficos para cada família, que atenderam aos critérios de segregação adotados 38

Introdução

1. Introdução

Litopenaeus vannamei é uma importante espécie de camarão marinho cultivada na aquicultura no Brasil e no mundo, nativa do Oceano Pacífico, onde sua distribuição natural vai do México, na Província de Sonora, até o Peru, ao Sul de Tumbes (BENZIE, 2000). Entretanto, muitos países têm cultivado esta espécie devido sua excelente adaptabilidade às diversas condições de cultivo como a facilidade de nutrição, manejo de cultivo e às suas altas taxas de produtividade e rentabilidade (BRASIL/DPA, 2001).

Devido à importância econômica dos camarões marinhos, muitos esforços têm sido empregados para construção de mapas genéticos de ligação em algumas espécies comercialmente exploradas, como *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (MOORE *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2003), *P. monodon* (WILSON *et al.*, 2002; STAELENS., 2008), *F. chinensis* (LI *et al.*, 2006) e *P. vannamei* (PÉREZ *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*;2007) abrindo um novo horizonte para o melhoramento genético e beneficiando, desta forma, o setor produtivo de cultivo de camarões. Tais estudos vêm sendo realizados através da utilização de marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e em alguns casos também microssatélites. Entretanto, análises utilizando marcadores AFLP em geral são mais comumente utilizadas devido ao fato de não ser necessário um prévio conhecimento do genoma do organismo a ser estudado, ao grande número de loci polimórficos produzidos, aos padrões de bandejamento gerados serem altamente reproduzíveis e ao pareamento dos primers utilizados ser altamente específico aos nucleotídeos adaptadores complementares, os quais

correspondem a posições originais no genoma da espécie e, conseqüentemente, podem ser explorados como marcos no mapa físico e/ou genético (VOS *et al.*, 1995).

A integração de mapas independentes é importante, pois a fusão de diferentes mapas em um único mapa, com alta densidade de marcas em comum, pode facilitar a identificação de marcadores que estão estreitamente ligados a um QTL ou a genes de interesse. Em camarões, poucos são os relatos sobre integração de mapas de ligação (WILSON *et al.*, 2002; STAELENS *et al.*, 2008).

A construção de mapas genéticos de ligação e identificação de QTLs são uma das mais importantes aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético de espécies de camarões, podendo facilitar o isolamento de genes, a seleção assistida por marcadores, o entendimento da herança, estrutura e organização dos genomas, estudos de evolução e introgressão.

Tendo em vista a importância econômica dos camarões e considerando a ausência de estudos de mapeamento genético neste animal em nosso país, o presente estudo teve como objetivo:

(1) Construir mapas genéticos de ligação para duas famílias de irmãos completos (G1) e (G2) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP com segregação 1:1 e 3:1;

(2) Integrar os mapas independentes referentes à duas famílias em um único mapa consenso;

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. *Litopenaeus vannamei* e seu cultivo

Os camarões destacam-se na categoria dos produtos aquáticos pelo alto valor nutritivo, constituindo uma importante fonte alternativa de proteína extremamente apreciada pelo homem e por apresentarem consumo cada vez mais elevado, principalmente entre os povos dos países mais desenvolvidos. Desta forma, os camarões, pela própria limitação dos estoques naturais que não suportam mais qualquer aumento da atividade extrativa, têm merecido a atenção dos cientistas pela possibilidade extraordinária que oferecem de aumentar a produção através da atividade de cultivo (NASCIMENTO *et al.*, 1995).

O cultivo de camarão marinho tem se destacado como um dos segmentos que mais se desenvolve no setor da aqüicultura. O rápido crescimento mundial desse tipo de cultivo ocorreu principalmente devido aos países costeiros tropicais emergentes das Américas e da Ásia. Esse crescimento teve como base de sustentação a crescente demanda do produto no mercado internacional, o atrativo nível de rentabilidade do agronegócio e a sua capacidade de gerar renda, emprego e divisas para o desenvolvimento dos países produtores (BORGHETTI *et al.*, 2003).

A capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo ajudou a levar o *L. vannamei* à posição de principal espécie da carcinicultura brasileira. De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (2004), no

Brasil, o *L.vannamei* é a espécie comercialmente cultivada com grande sucesso, que foi introduzida para fins de cultivo em 1983. Entretanto, somente a partir do início dos anos 90, quando alguns laboratórios de larviculturas privados viabilizaram a produção em larga escala de pós-larvas dessa espécie é que as validações tecnológicas realizadas pelas fazendas de camarão nos Estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba demonstraram a supremacia do *L. vannamei* em relação às espécies nativas. Esta espécie não ocorre originalmente na costa brasileira, sendo restrita ao Oceano Pacífico e sua distribuição natural vai do México (Província de Sonora) até o Peru (Sul de Tumbes) (BENZIE, 2000). Entretanto, por se tratar de um animal exótico, foi necessária uma produção auto-suficiente de pós-larvas e oferta de rações de boa qualidade (BRASIL/DPA, 2001).

O *L. vannamei* é um crustáceo decápodo, pertencente à família Penaeidae. Segundo Dall et al. (1999), os membros da família Penaeidae apresentam um ciclo de vida semelhante com desenvolvimento dos estágios: larva (náuplio), protozoa, misis, pós-larva, juvenil e adulto. As diferenças estão relacionadas com a preferência das pós-larvas, juvenis e adultos por determinadas áreas durante seu ciclo de desenvolvimento. Do ponto de vista citogenético, *L. vannamei* foi estudado por Ramos (1997), onde o autor descreve o cariótipo desse camarão constituído pelo número diplóide $2n=88$ cromossomos.

A maioria das fazendas de camarão marinho no Brasil utiliza pós-larvas (PLs) produzidas em laboratórios especializados, que são aclimatadas à salinidade, temperatura e pH idênticos ao da água para onde serão

transferidas. O cultivo compreende basicamente duas fases: a larvicultura; responsável pela produção de pós-larvas (PLs), e a engorda, responsável pelo crescimento do camarão até a idade de comercialização. A larvicultura é realizada em laboratórios especializados e inicia-se a partir da obtenção dos reprodutores, que podem ser capturados diretamente na natureza (mar aberto, baías, lagoas costeiras) ou, no caso de espécies exóticas, obtidas através de importação. Ela é subdividida em dois diferentes setores, a maturação e o berçário. A maturação é o setor responsável pelo acasalamento e a desova. Em geral, machos e fêmeas são mantidos juntos, em tanques apropriados, até que ocorra o acasalamento. Após o acasalamento, as fêmeas ovadas são transferidas para o tanque de desova, retornando, posteriormente, aos tanques de maturação. Um recurso comumente praticado para promover a maturação nas fêmeas e um maior número de desovas é a ablação, que consiste na retirada de um dos pedúnculos oculares que contém glândulas relacionadas com a reprodução. Uma fêmea ablada pode produzir até 300 mil ovos por desova e maturar até cerca de quatro vezes ao mês (ARANA, 1999).

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

O *L. vannamei* tem uma excelente performance em cultivo, se desenvolvendo muito bem em uma salinidade entre 15 e 30‰, com

temperatura entre 23 e 30°C. O requerimento alimentar para o cultivo em confinamento, em termos de ração peletizada contempla uma carga de proteínas que pode variar entre 22 e 40%, em dependência da intensificação do cultivo nos viveiros; da capacidade de tolerância em alta densidade de estocagem; do baixo requerimento protéico da sua dieta alimentar; e da produtividade natural das águas em uso. A escolha da espécie para cultivo em viveiros segue, portanto, os critérios de seu desempenho em outros empreendimentos dentro das mesmas características físicas na região e ainda na disponibilidade de pós-larvas. Quanto à aceitação comercial da espécie, que garante o custeio de todo o ciclo produtivo, o *L. vannamei* é significativamente preferido entre as demais espécies no mercado nacional e internacional, com forte demanda compradora (COSTA, 2006).

2.2. Marcadores moleculares e a técnica de AFLP

Os marcadores moleculares são regiões do DNA que apresentam variações na sua seqüência, sem que isso implique necessariamente em mudanças significativas nas funções do organismo. São abundantes nos genomas e não sofrem influências ambientais, revelando diretamente os polimorfismos de seqüências de DNA. As características desejáveis para os marcadores moleculares são: que sejam altamente polimórficos, cubram todo o genoma, sejam seletivamente neutros, no sentido de não afetarem o caráter em questão nem as características reprodutivas do indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MONTAÑO-PEREZ *et al*, 2004).

Em estudos genéticos de microorganismos, animais e plantas, os marcadores moleculares vêm desempenhando um papel importante. Segundo Montañó-Perez *et al* (2004), em programas de melhoramento genético, estes marcadores são importantes na verificação da presença de caracteres desejados, inclusive desde os primeiros estágios larvais, uma vez que a análise é realizada no genoma e não apenas na observação de determinada característica fenotípica.

Os marcadores moleculares baseados em DNA revolucionaram o modo como pesquisas genéticas na aqüicultura são conduzidas e incluem: RAPD, RFLP, AFLP, microssatélites e SNPs. Estes marcadores têm sido empregados em: programas de melhoramento genético, análise de variabilidade genética, endocruzamentos, identificação de espécies, construção de mapas de ligação e

detecção de QTL entre outras aplicações. (LIU; CORDES, 2004; MONTAÑO-PEREZ et al., 2006).

Várias dessas técnicas moleculares só são possíveis graças a uma outra técnica conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”), desenvolvida na década de 80 por Mullis e Fallona (1987). A técnica da PCR baseia-se na amplificação de um segmento específico de DNA, na qual uma seqüência de oligonucleotídios iniciadores (“primers”) se hibridizam à seqüência de DNA a ser amplificada. Repetidas desnaturações térmicas da fita de DNA permitem o pareamento dos “primers” à seqüência complementar do DNA molde e conseguinte extensão desses pela DNA polimerase. Os produtos da amplificação podem também se hibridizar com os iniciadores a cada ciclo de desnaturação e pareamento, duplicando exponencialmente o fragmento alvo (SAIKI *et al.*, 1988). Os iniciadores são oligonucleotídios de até 20 ou 25 pb que servem de iniciação para a síntese de DNA pela enzima Taq DNA polimerase. A PCR permite a amplificação do DNA em forma de fita dupla ou simples e com a transcrição reversa do RNA em cDNA, o RNA poderá ser também utilizado (ERLICH *et al.*, 1991).

Foi desenvolvida uma técnica baseada na PCR, chamada AFLP (“Amplified Fragment Length Polimorphysm”, ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados), que é essencialmente intermediária entre o RFLP e a PCR. O marcador AFLP analisa a presença ou ausência de sítios de enzimas de restrição e as seqüências polimórficas adjacentes a esses sítios. Três etapas são necessárias para obtenção de marcadores AFLP: 1- digestão do DNA genômico com duas diferentes enzimas, como MseI (enzima de corte

frequente) e EcoRI (enzima de corte raro); 2- ligação de oligonucleotídeos adaptados à extremidade da restrição; 3- seleção de fragmentos por duas ampliações sucessivas de PCR, usando iniciadores complementares aos oligonucleotídeos adaptados, com 1 a 3 nucleotídeos seletivos adicionais (VOS *et al.*, 1995).

De acordo com Vos *et al.* (1995), a técnica AFLP tem muitas vantagens sobre a técnica RAPD. Primeiro, um maior número de *loci* podem ser analisados por experimento, sendo obtido um número de marcas informativas aproximadamente dez vezes maior por análise. Segundo, os marcadores AFLP geram padrões de bandamento altamente reproduzíveis, devido ao pareamento altamente específico de "primers" aos nucleotídeos adaptadores complementares. Por outro lado, a técnica RAPD pode apresentar uma falta de reprodutibilidade, que pode ser causada por um pareamento desigual dos "primers" aleatórios. Os marcadores AFLPs parecem ser tão reproduzíveis quanto os RFLPs, mas são tecnicamente mais exigentes e requerem mais DNA. Devido à sua grande cobertura genômica (em média eles geram 100 bandas por gel comparado com 20 bandas dos marcadores RAPDs), os AFLPs são particularmente bons para mapeamento genômico e "fingerprinting", e podem ser usados para calcular distâncias genéticas entre genótipos. A única desvantagem destes marcadores é a dificuldade de discernir entre heterozigotos e homozigotos, uma vez que a grande maioria deles é de natureza dominante (MONTAÑO-PÉREZ *et al.*, 2006).

Na metodologia tradicional de AFLP, os fragmentos são visualizados através do uso de marcadores radioativos, entretanto, a utilização de

iniciadores marcados com corantes fluorescentes gera a técnica fAFLP ("Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism" ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados Marcados por fluorescência). Ela surge como uma alternativa viável que torna os trabalhos mais ágeis para obtenção dos resultados, podendo-se determinar precisamente o tamanho dos fragmentos amplificados do genoma, qualificando como uma verdadeira técnica de "fingerprinting", desde que sejam utilizados os mesmos reagentes e instrumentos para determinar os fragmentos por fAFLP (DESAI *et al.*, 1998).

2.3. Mapeamento Genético

Para se construir mapas genéticos de ligação normalmente são empregados grande número de marcadores moleculares, sejam eles *loci* específicos dominantes (como RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso; AFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) ou loco co-dominante (como microssatélites; RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos obtidos por cortes da fita dupla de DNA).

O mapeamento genético é uma ferramenta biotecnológica que vem sendo utilizada em diversas espécies a fim de se conhecer a ordem e localização dos genes ou de marcadores genéticos de interesse. Sendo também utilizados por permitirem a cobertura e análise completa de genomas; a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos; a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, bem como a quantificação do seu efeito e por facilitar o melhoramento assistido e a clonagem baseada em mapa (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os mapas genéticos podem ser físicos, nos quais se localizam os genes ou marcadores genéticos diretamente nos cromossomos ou podem ser mapas de ligação, onde são construídos pela análise de co-segregação dos marcadores genéticos nos produtos da meiose durante a formação dos gametas, baseados em distâncias de recombinação. Ambos podem ser desenvolvidos utilizando técnicas moleculares já estabelecidas (DAVIS; HETZEL, 2000).

O desenvolvimento de mapas genéticos envolve a seleção da população mais apropriada para mapear; o cálculo das frequências de recombinação em pares, usando esta população; o estabelecimento de grupos de ligação; a estimativa das distâncias no mapa entre marcas e a determinação da ordem linear por marcadores. Quanto maior o tamanho da progênie, mais precisa será a estimativa da frequência de recombinação genética entre os marcadores, porém mais trabalhosa a pesquisa. Estima-se que, no mínimo, deva-se utilizar uma amostra em torno de cem indivíduos para a identificação de genes ou regiões genômicas de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Ao se iniciar um programa de melhoramento, o conhecimento dos componentes genéticos de cada população envolvida é indispensável. No caso de mapeamento de locos, a tecnologia de ferramentas moleculares é uma alternativa eficiente, a qual facilita e possibilita acelerar os programas de melhoramento.

Atualmente um mapa genético pode ser desenvolvido para qualquer espécie em um período de tempo relativamente curto, desde que exista algum grau de variação genética nas famílias que estão sendo analisadas para o mapeamento. As distâncias de recombinação são determinadas estatisticamente baseadas em uma análise de segregação dos marcadores polimórficos (LUNDIN *et al.*, 1999), sendo caracterizado pela definição dos marcadores em grupos de ligação (DANZMANN; GHARBI, 2001).

A utilização de técnicas de biologia molecular em programas de mapeamento genético de ligação em camarões tem mostrado avanços em algumas espécies nos últimos anos, abrindo um novo horizonte para o

melhoramento genético, beneficiando, desta forma, o setor produtivo de cultivo de camarões. Mapas genéticos de ligação podem exercer um papel importante em muitas áreas da genética, incluindo análises de QTL, clonagem de genes baseado em mapa, MAS (Marker Assisted Selection) e genômica comparativa (LI *et al.*, 2006).

A maioria dos mapas genéticos de ligação para camarão foram gerados usando a tecnologia de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) (VOS *et al.*, 1995), em parte pela dificuldade para se obter um grande número de outros marcadores como os microssatélites de espécies peneídeos (LI *et al.* 2003). Por outro lado, o marcador molecular AFLP pode ser aplicado sem nenhum conhecimento prévio do genoma e tem gerado mapas genéticos em *M. japonicus* (MOORE *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2003), *P. monodon* (WILSON *et al.*, 2002; STAELENS *et al.* 2008), *P. vannamei* (PÉREZ *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*;2007) e *P. chinensis* (LI *et al.*, 2006) com uma eficiência relativamente elevada.

O primeiro mapa genético de ligação específico para sexo do camarão marinho *L.vannamei*, obtido através da estratégia denominada de duplo *pseudo-testcross*, desenvolvida por Grattapaglia e Sederoff (1994), foi realizado por Pérez *et al.* (2004) baseado em marcadores AFLP. Os autores utilizaram 42 indivíduos F₁ e 103 combinações de primers, resultando em 741 bandas segregantes. A média de bandas polimórficas segregantes encontradas por gel/por combinação de primer foi de 7,1. Um total de 51 e 47 grupos de ligação para o mapa de macho e fêmea foram encontrados neste estudo, resultando no comprimento total do genoma de 2771 cM e 2116 cM, respectivamente.

Posteriormente, marcadores moleculares AFLP e microssatélites foram utilizados por Zhang *et al.* (2007) para a construção de outro mapa de ligação para *L.vannamei*. Neste estudo utilizou-se 108 combinações de primers AFLP e 30 marcadores microssatélites, obtendo 45 grupos de ligação para o mapa de macho e fêmea. O comprimento total dos mapas apresentou-se com 3220.9 cM e 4134.4 cM.

Na literatura encontram-se muitos trabalhos sobre mapas genéticos de ligação independentes em vários organismos, utilizando populações diversas com uso de diferentes marcadores moleculares. A integração desses mapas é importante, pois a fusão de diferentes mapas em um único mapa, com alta densidade de marcas em comum pode facilitar o desenvolvimento de marcadores que estão estreitamente ligados a um QTL ou a genes de interesse. Programas de computadores bem estabelecidos, tais como Map-Maker, Linkage-1 e GQMOL (LANDER; GREEN, 1987; SUITTER *et al.*, 1983; CRUZ; SCHUSTER, 2001), tem sido utilizados para análises desses dados. A integração de mapas em diferentes famílias provenientes de diversos cruzamentos pode ser útil para determinar as relativas posições de transferência de marcas.

O fator chave na integração de mapas distintos é que estes possuam marcadores comuns, de forma a serem "âncoras" que possam interligá-los. Apenas quando um número mínimo de "âncoras" é disponível, mapas distintos podem ser representados juntos. Porém, ainda que marcadores comuns estejam disponíveis, alguns problemas aparecem. Não apenas devido à precisão das estimativas da frequência recombinação que varia muito entre o conjunto de dados, mas também do tipo de informação utilizada. (SALGADO, 2008).

A integração de mapas derivados de várias populações tem diversas vantagens, em particular eles aumentam a saturação do mapa e cobertura do genoma e a ordem das marcas comuns tornam-se mais precisas. Mapas integrados também são usados em estudos comparativos entre espécies (BEAVIS; GRANT 1991) e tem evidenciado rearranjos cromossômicos entre grupos de ligação homólogos (DIRLEWANGER *et al.*, 2004).

A integração de mapas de ligação tem sido descrito na literatura para espécies vegetais, porém em animais estão sendo pouco relatado. Em camarão são encontrados poucos trabalhos relatados na literatura (WILSON *et al.*, 2002; STAELENS *et al.*, 2008).

Um mapa integrado foi construído para o camarão *P. monodon* utilizando 23 combinações de primers AFLP em três famílias de referência (42 indivíduos para cada família) de pedigree conhecido, onde os indivíduos utilizados para o cruzamento foram capturados em mar aberto (selvagens). Um total de 673 locos polimórficos segregantes AFLP foram obtidos e utilizados na construção de mapas independentes para cada família, onde 116 marcadores AFLP comuns foram encontrados entre as três famílias e estes foram utilizados para a construção do mapa integrado. A cobertura do genoma estimada para o mapa de ligação integrado foi 1412 cM apresentando 20 grupos de ligação (WILSON *et al.*, 2002).

Outro mapa genético de ligação integrado foi construído para o camarão *P. monodon* específico para sexo, resultando em 44 grupos de ligação para macho e 43 grupos para fêmea através de 2306 marcadores segregantes AFLP em três famílias, apresentando uma cobertura estimada do genoma de 2378 e

2362 cM, respectivamente. Vinte e um grupos de ligação homólogos, incluindo os grupos de ligação para sexo, foram identificados dentre os mapas de ligação para macho e fêmea, totalizando 70 marcadores comuns AFLP. As famílias foram produzidas a partir de cruzamentos controlados sobre condições específicas livres de patógenos no Moana Technologies no Hawaí, sendo os parentais originados de estoques de cultivo. Duas famílias, nomeadas FAM1 e FAM2, tem "IC67" como uma fêmea parental em comum, enquanto que FAM2 e FAM3 tem "AL91" como um macho parental em comum. Foram genotipados 93 indivíduos para cada família utilizando mais de 100 combinações de primers AFLP (STAELENS *et al.*, 2008).

A grande maioria das características herdáveis de importância econômica resultam da ação conjunta de vários genes. Essas características são conhecidas como poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, sendo denominados de QTLs (Quantitative Trait Loci) os locos que controlam os fenótipos resultantes.

Segundo Ferreira; Grattapaglia (1998), por meio de marcadores moleculares pode-se mapear QTLs e entender a arquitetura de características quantitativas, ou seja, o número, posição, ação gênica, magnitude de efeito e interações. Se determinado marcador estiver fisicamente ligado a um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção do marcador implica a seleção indireta do gene de interesse. A capacidade de detectar um QTL depende da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL e da herdabilidade da característica. Conforme os mesmos autores, o

principal problema na identificação de QTLs refere-se à expressão final do fenótipo, a qual sofre a ação de vários fatores genéticos e ambientais.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção da geração segregante F₂

Os progenitores (04 indivíduos- parentais F₀) utilizados para a obtenção das progênes (população segregante F₂) são linhas “puras”, mantidas separadamente como linhagens distintas no Centro de Genética da Empresa Privada Aquatec, localizado em Barra do Cunhaú, município de Ganguaretama, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A empresa apresenta seu próprio programa de melhoramento genético desde o ano de 1998. Anteriormente, estudos de diversidade genética foram realizados nos parentais F₀ por Rocha et al., (2005) baseados em marcadores microsatélites. Os resultados mostraram que essas linhas apresentavam um considerável nível de diferenciação genética entre elas, sendo, portanto ideal para a construção da população F₂ de mapeamento genético. Todo o experimento para a obtenção da população segregante F₂ foi conduzido no laboratório de larvicultura pertencente ao Centro de Genética da empresa descrita acima no ano de 2004. As linhas “puras” utilizadas para o cruzamento para obtenção das duas famílias (G1:192 indivíduos e G2:192 indivíduos) de irmãos completos apresentam as seguintes características:

Linha pura Panamá: essa linha foi importada em 1997 do Panamá (camarões reprodutores selvagens), tendo uma ótima adaptação a condições de cultivo aqui no Brasil, sendo resistente a doenças bacterianas e viróticas. No

momento do cruzamento para obtenção da população segregante F_2 , essa linha encontrava-se na geração F_7 .

Linha pura Venezuela: essa linha foi importada em 1997 da Venezuela (camarões reprodutores) e se encontrava na geração F_{15} . Os animais desta linha apresentam um crescimento maior do que as outras linhas. A fêmea é uma boa reprodutora, sendo desnecessária a ablação. É uma linha menos resistente a doenças. Essa linha encontrava-se na geração F_{22} no momento do cruzamento para obtenção da população segregante F_2 .

Linha pura Equador: essa linha foi importada em 1998 do Equador (náuplios e PLs selvagens), foi a que menos se adaptou as condições de cultivo aqui no Brasil. Os animais apresentam-se menores e menos resistentes a doenças. No momento do cruzamento para obtenção da população segregante F_2 , essa linha encontrava-se na geração F_8 .

Foram realizados dois cruzamentos das linhas puras (parentais F_0) para a obtenção de duas famílias de irmãos completos (população segregante F_2), que são consideradas como família G1 (Panamá x Venezuela) e família G2 (Panamá x Equador).

As famílias F1 de irmãos-completos da composição P x V e P x E foram intercruzadas para produzir as populações de mapeamento F2.

Foi utilizado o método de inseminação artificial manual para os cruzamentos (machos e fêmeas especificados), onde os camarões reprodutores foram separados em famílias por tanque e fêmeas maduras ablatadas foram inseminadas manualmente com espermatozoides dos machos e mantidas em caixas próprias para a desova. Durante o período de 12 h os ovos eclodiram

liberando os náuplios. No dia seguinte, os náuplios foram coletados em baldes e transferidos para o Setor de Larvicultura por 35 dias até atingirem a idade de pós-larvas (PL 25). Em seguida, as pós-larvas foram transferidas para o Setor de Crescimento, onde foram colocadas em covos (uma família por covo) e estes ficaram mergulhados nos tanques de crescimento até atingirem o peso de 2g. Nesta fase, os animais foram marcados com elastômero para distinguir a família a qual pertence. Foram feitas as seguintes marcas:

Família G1 – P*P (cor rosa);

Família G2 – A*A (cor azul);

Depois de marcados, os animais permaneceram em tanques até atingirem o peso médio de 15g, onde ocorreu a despesca. Primeiramente, os animais foram retirados dos tanques e transportados em baldes e mantidos em caixas com oxigenação até serem pesados individualmente para a coleta dos dados. Após a avaliação do peso, os camarões foram colocados em baldes com gelo e ensacados com a identificação da família a qual pertenciam e congelados a -20°C. No dia seguinte, foi coletado em torno de 1g de tecido muscular da cauda dos camarões congelados, e fixados em microtubos tipo eppendorf de 2 mL contendo 0,1M de EDTA e etanol absoluto. Esses tubos foram mantidos em freezer até o momento em que foram transportados para o Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP, onde foram novamente mantidos em freezer até o momento da realização da extração de DNA.

3.2. Extração do DNA genômico

Vários procedimentos de extração de DNA genômico de tecidos musculares de camarão têm sido descritos na literatura. A maioria dos protocolos existentes envolve cinco etapas básicas: maceração do tecido fresco; ressuspensão do material em tampão de extração; utilização de um solvente orgânico, para posterior separação por centrifugação das fases orgânica e aquosa, ficando o DNA na parte aquosa e finalmente, a precipitação do DNA pela presença de sal e álcool.

Alguns protocolos podem fornecer DNAs degradados ou contaminados que, apesar de possibilitar amplificações por PCR, podem comprometer a reprodutibilidade das reações, resultando muitas vezes, em falsos negativos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A metodologia que apresentou os melhores resultados para os propósitos do presente trabalho foi a descrita por Aljanabi; Martinez (1997), com algumas modificações.

Pequenos pedaços de tecidos musculares (aproximadamente 50 mg) foram macerados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido. Posteriormente adicionou-se 800 µL de tampão salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 10mM pH8,0 e EDTA 2mM pH8,0), homogeneizando bem. Adicionou-se 80 µL de SDS 20% e 16 µL de proteinase K (20mg/mL) e homogeneizando novamente. Esta suspensão foi transferida para microtubos de 2,0 ml, mantidos em banho regulado à 56°C durante 4 h, tempo necessário para que a solução ficasse homogênea. Após esta etapa, os microtubos permaneceram por alguns

minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 300 µL de NaCl 6M, homogeneizou-se em vórtex por 30 s e centrifugou-se por 30 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recuperado, transferindo-o para um novo tubo. Foi adicionado igual volume de isopropanol, homogeneizando-se delicadamente. As amostras foram incubadas à -20°C por 2 h. Posteriormente o material foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm. Foram adicionados ao precipitado 800 µL de etanol 70% gelado e centrifugou-se por 5 minutos. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante, deixando-se o precipitado por 15 minutos em fluxo laminar. Posteriormente, o precipitado foi ressuspendido em 100-300µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) pH 8,0. O DNA foi tratado com RNase (20mg/mL), misturando suavemente, deixando-o em repouso por 1h à 37°C. As amostras de DNA foram acondicionados em freezer à -20°C.

A verificação da integridade do DNA das amostras foi analisada, após a eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão de corrida TEB 1X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3).

3.3. Quantificação do DNA em Espectrofotômetro

Todas as bases nitrogenadas absorvem a luz ultravioleta e os ácidos nucléicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximos aos 260 nm. Por isso, a quantificação do DNA de cada amostra foi realizada por espectrofotometria com luz ultravioleta, e utilizando a relação $1\text{ DO}=50\text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA (MANIATIS *et al.*, 1982).

Além da concentração de DNA, observou-se a relação 260/280 (ácidos nucléicos/proteínas) para verificação da pureza e qualidade do DNA, que, segundo Sambrook *et al.* (1989), o ideal é que esta relação seja entre 1,8 a 2,0. Para verificação dos resultados e análise da integridade do DNA, também foi realizada uma quantificação em gel de agarose 0,8 %.

Após a quantificação, foi preparada uma solução de trabalho de 500 μL , onde o DNA foi diluído em água estéril filtrada para a padronização da concentração do DNA de cada amostra individual para 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. O DNA original foi diluído com em TE (10mM TRIS-HCL, pH 8,0, EDTA 0,1mM) e mantido em freezer (-20 °C). Para algumas amostras, por apresentarem uma concentração menos elevada de DNA, não foi necessário a realização desta diluição.

3.4. Marcador Molecular fAFLP

A metodologia para análise por fAFLP foi realizada conforme Manual de Instrução do kit "AFLP Plant Mapping da Applied Biosystems" (1997) , com algumas adaptações feitas para as amostras avaliadas, seguiu as seguintes etapas:

Preparo do DNA molde e ligação dos adaptadores: o primeiro passo da técnica fAFLP é a geração de fragmentos de restrição pelo uso de duas endonucleases de restrição (*EcoRI* e *MseI*). Os adaptadores que constam de cada kit são ligados nas extremidades dos fragmentos de DNA, gerando um DNA molde para a subsequente amplificação por PCR.

Amplificação Pré-seletiva: as seqüências dos adaptadores e o sítio de restrição servem como um local de ligação do "primer" para uma subsequente seleção de baixo nível ou amplificação pré-seletiva dos fragmentos de restrição.

O "primer" complementar *MseI* contém uma Citosina na extremidade 3'. O "primer" complementar *EcoRI* contém uma Adenina na extremidade 3'. Apenas aqueles fragmentos genômicos que tenham um adaptador em cada extremidade amplificam exponencialmente durante a amplificação por PCR. Esse passo efetivamente "purifica" o alvo a partir de seqüências que amplificam apenas linearmente, ou seja, aquelas com uma extremidade modificada.

Amplificação seletiva: Amplificações adicionais por PCR são feitas para reduzir a complexidade da mistura de tal modo que possa ser resolvida em um gel de poliacrilamida. Essas amplificações usam "primers" escolhidos a partir de 24 possíveis "primers" AFLP seletivos (oito "primers" *MseI*, 8 "primers"

EcoRI- genomas de tamanho regular e 8 "primers" *EcoRI*- genomas de tamanho pequeno). Após a amplificação por PCR com esses "primers", uma porção de cada amostra será analisada em um Sequenciador de DNA da Perkin-Elmer Applied Biosystems.

A amplificação seletiva com um "primer" *EcoRI* (marcado com fluorescência) e um "primer" *MseI* amplifica principalmente fragmentos com extremidades *EcoRI-MseI*. Os fragmentos com extremidades *EcoRI-EcoRI* não amplificam bem, e portanto não são visualizados no gel. Os fragmentos *MseI-MseI* não são visualizados porque eles não contêm a marcação com corantes fluorescentes. Apenas os fragmentos contendo extremidade *EcoRI* serão detectados. Genomas individuais produzem distintos perfis de fragmentos de restrição com cada par de "primer" de amplificação.

A seguir têm-se as etapas detalhadas da técnica de fAFLP realizadas com o DNA genômico do *L. vannamei*:

Digestão do DNA: O DNA genômico foi digerido utilizando-se a seguinte reação: 500 ng de DNA (10 μ l), acrescido de 1,25 μ l de tampão React 1 (500 mM Tris-HCL pH 8,0, 100 mM MgCl₂), 5 U de *EcoRI* (0,5 μ l) e 1,5 U *MseI* (0,3 μ l). Esta reação foi incubada por 14 horas a 37°C, e, em seguida, as enzimas foram inativadas por 10 minutos a 65°C.

Ligação dos adaptadores: Foram retirados 3,67 μ L da reação de digestão e acrescidos de 1 μ L de tampão T4 DNA ligase, 0,5 μ L T4 DNA ligase, 0,33 μ L do adaptador para o corte da *MseI* e 0,33 μ L do adaptador para o

corde da *Eco* RI (ambos adaptadores previamente desnaturados a 95°C por 5 min). A ligação ocorreu por duas horas a 20 °C e então, foi diluída 8,7 vezes em água.

Amplificação Pré-seletiva: Retirou-se 4 µL da reação diluída preparada a partir das reações de digestão e ligação dos adaptadores e acrescentou-se 1 µL dos oligonucleotídeos iniciadores pré-seletivos AFLP *Eco* RI e *Mse* I e 15 µL de "AFLP Core mix". As amostras foram colocadas no termociclador MJ Research, INC, modelo PTC 100, cujo programa consistiu inicialmente de dois minutos à 72°C, 20 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos, e finalizando à 60°C por 30 minutos.

Após a verificação da reação pré-seletiva em gel de agarose a 1%, os produtos amplificados na reação pré-seletiva foram diluídos 5,5 vezes e 3,0 vezes.

Amplificação seletiva: Retirou-se 1,5 µL da reação de amplificação pré-seletiva diluída e acrescentou-se 7,5 µL do "AFLP Core mix", 0,5 µL do primer-AXX da *Eco* RI marcado por fluorescência e 0,5 µL do primer-CXX da *Mse* I. Após o preparo das reações, as amostras foram colocadas no termociclador MJ Research, INC, modelo PTC 100. A amplificação foi iniciada com uma etapa desnaturante inicial de 94 °C por dois minutos, seguidas de 10 ciclos de 94 °C por 20 segundos, seguidos de 66 °C (diminuindo um grau por ciclo) por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, 21 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por dois minutos e uma etapa final de 60 °C por 30 minutos.

Após as ampliações, os produtos foram analisados em um seqüenciador automático ABI 3100 Avant (Applied Biosystems), através dos softwares GeneScan 3.1 e Genotyper 3.11.

Procedimento de aplicação das amostras no seqüenciador: preparou-se uma solução contendo 8,85 µL de formamida deionizada e 0,15 µL do padrão interno de peso molecular GeneScan-500 ROX marcado por fluorescência com a coloração vermelha. Adicionou-se à reação seletiva 9,0 µL desta solução, e no termociclador desnaturou-se a reação a 95°C por 5 minutos e 4°C por 5 minutos. Foi aplicado 1,5 µL de cada amostra no seqüenciador capilar.

O padrão interno de peso molecular Gene Scan-500 ROX usado no fAFLP, possui 15 fragmentos com os seguintes comprimentos em pares de bases (pb): 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500.

O software GeneScan Analysis coleta os dados obtidos dos produtos amplificados e realiza a leitura dos eletroferogramas, indicando o tamanho dos alelos em pares de bases e a sua amplificação através da altura dos picos detectados. O software Genotyper usa como fonte de análise os dados obtidos através do "software GeneScan", indicando quais são os alelos presentes nas amostras através de uma pré-definição dos alelos presentes nesta população, gerando tabelas binárias de presença (1) e ausência (0) de picos polimórficos.

3.4.1. Combinações de “primers” marcados com fluorescência

Foram testadas 24 combinações de primers, sendo 08 com marcação verde (JOE), 08 com marcação amarela (NED) e 08 com marcação azul (FAM), conforme descrito na Tabela 01.

Para testar todas as 24 combinações de primers foram utilizadas 06 amostras de DNA (pertencentes a família G01 e G02)

Tabela 1. Combinações de primers (EcoRI-MseI) testados com o fAFLP. As combinações de primers em negrito foram escolhidas e utilizadas nos parentais e na população segregante F2.

JOE	FAM	NED
1- ACG-CAA	9- ACA-CTG	17- AAC-CAA
2- AGG-CAG	10- ACT-CAC	18- AGC-CAC
3- AAG-CAG	11- ACA-CAT	19- ACC-CAG
4- ACG-CAC	12- ACT-CAA	20- AAC-CAT
5- AGG-CAT	13- ACA-CTC	21- AGC-CTG
6- AAG-CTA	14- ACT-CTT	22- ACC-CTC
7- ACG-CTC	15- ACA-CAA	23- AAC-CTT
8- AGG-CTT	16- ACT-CAA	24- AGC-CTG

3.4.2. Construção do mapa de ligação

Foi realizada uma análise através do software Genotyper para identificar os locos polimórficos nas populações segregantes F2 a partir dos locos identificados primeiramente nos parentais (parental 1 e 2). Para cada loco polimórfico identificado verificou-se, para cada indivíduo das populações segregantes F2, a presença, representada pelo algarismo 1, a ausência por 0, dados perdidos pelo algarismo 9, resultando em uma tabela binária de locos polimórficos.

O software GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2001) foi utilizado para as análises de segregação mendeliana, construção dos mapas de ligação. Este software é um aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos.

A análise de segregação foi realizada através do teste "qui-quadrado" (χ^2), sendo estabelecido um nível de decisão: $\alpha=0,01$ e obtido um valor de p para cada teste individual. Somente os marcadores polimórficos presentes no parental 1 ou 2, que segregavam na proporção mendeliana de 1:1, com $p \leq 0,01$ e para os locos polimórficos encontrados em ambos os parentais, que apresentavam segregação mendeliana na proporção 3:1, com $p \leq 0,01$ foram considerados e utilizados para a construção dos mapas de ligação referente a duas famílias G1 e G2. Marcadores que não se apresentavam dentro da segregação mendeliana esperada foram descartados, não sendo usados nas análises de ligação para construção dos mapas genéticos.

A frequência de recombinação foi estimada para 2 marcadores por vez em cada grupo de ligação, a frequência de recombinação foi calculada e os locos foram alocados nos grupos de ligação conforme o valor obtido para o LOD (*log off the odds*) que é a probabilidade de duas marcas estarem ligadas à uma dada fração de recombinação dividido pela probabilidade dessas duas marcas não estarem ligadas, no logaritmo de base 10. Somente pares de marcadores que apresentavam valores de $LOD \geq 3$ e com frequência máxima de recombinação igual a 30 centi Morgans foram considerados ligados. Distância de mapa em centiMorgans foi calculada usando a função de mapeamento de Kosambi (1944).

A integração dos mapas referentes a famílias G1 e G2 foi realizada através da metodologia proposta por Salgado (2008) incorporada no programa GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2001). Para identificar grupos de ligação homólogos entre as famílias foi realizada uma análise para se saber quais eram os marcadores comuns AFLP (marcas âncoras), onde o requisito era encontrar no mínimo duas marcas âncoras entre os grupos para poder realizar a integração desses grupos. Marcadores AFLP são considerados comuns quando apresentam o mesmo tamanho em pares de bases, usando a mesma combinação de primer.

Resultados

4. Resultados

4.1. Amplificação de DNA e obtenção do perfil de AFLP

A amplificação via PCR do DNA genômico dos parentais das famílias G1 e G2 (machos e fêmeas) e de ambas as populações F_2 segregantes (192 indivíduos para cada família) de *L. vannamei* foi realizada através da utilização de nove combinações de primers AFLP (Tabela 02). A qualidade dos produtos amplificados obtidos das amostras de DNA dos parentais com as nove combinações de primers mostrou-se satisfatória, identificando claramente picos bem definidos. Através do estabelecimento dos locos presentes nas amostras dos parentais, foi possível verificar a presença de locos polimórficos presentes também na população F_2 das duas famílias. As análises para estabelecimento dos grupos de ligação e construção do mapa de ligação foram feitas separadamente para cada uma das famílias e posteriormente foi realizada a integração dos mapas através de marcas comuns AFLP referentes às duas famílias aqui estudadas.

4.2. Mapa de ligação para família G1

Um total de 270 locos polimórficos dominantes AFLP com tamanhos variando entre 50 e 500 pares de bases foram produzidos através da utilização de nove combinações de primers *EcoRI/MseI*. O número de locos polimórficos gerado por estas combinações variou de um máximo de 50 para a combinação ACT-CAA (FAM) a um mínimo de 18 para ACC-CAG (NED), sendo observada uma média de 30 locos polimórficos por primer.

A análise de segregação, realizada através do teste "qui-quadrado" (X^2) feita pelo software GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2001), revelou que 104 locos polimórficos estavam presentes no parental macho ou fêmea, mas somente 58 destes locos segregavam na proporção mendeliana de 1:1 com $p \geq 0,01$. O restante (46 locos) apresentaram um desvio de 44% da proporção mendeliana esperada. Por outro lado, 166 locos polimórficos foram encontrados em ambos os parentais, sendo observados apenas 45 locos com segregação mendeliana na proporção 3:1 ($P < 0.01$). Para os locos segregantes, encontrou-se uma média de 11,4 por primer, sendo observado um total de 103 locos polimórficos segregantes (Tabela 2).

Para a construção do mapa de ligação foram selecionados os 103 marcadores polimórficos que apresentaram segregação esperada (58 com segregação 1:1 e 45 com segregação 3:1). Deste total, 98 marcadores (95%) apresentaram-se alocados em algum grupo de ligação, sendo possível estabelecer quatorze grupos de ligação (Figura 1). O número de marcadores distribuídos nos diferentes grupos de ligação estabelecidos variou de um

mínimo de 2 marcadores a um máximo de 42 marcadores por grupo, sendo observada uma média de 7 marcadores por grupo. O comprimento dos grupos de ligação variou de 1.70 cM a 192.78 cM, sendo que o mapa genético obtido gerou uma cobertura do genoma estimada em torno de 349.98 cM, de acordo com a função de Kosambi.

Tabela 2. Combinações de primers AFLP utilizadas nas ampliações de PCR, nomenclatura utilizada nos mapas de ligação e número de locos polimórficos para cada família, que atenderam aos critérios de segregação adotados.

Fluorescência usada	EcoRI Base seletiva	MseI Base seletiva	^a Nomenclatura Kocher <i>et al.</i> (1998)	Nº Locos Segregantes Família (G1)	Nº Locos Segregantes Família (G2)
JOE	AGG	CAG	59	12	12
FAM	ACT	CAC	42	10	01
NED	AAC	CAA	01	12	13
JOE	ACG	CAC	34	14	07
FAM	ACT	CTT	48	08	06
NED	ACC	CAG	27	05	03
JOE	AAG	CAG	11	12	08
FAM	ACT	CAA	41	17	06
NED	AGC	CTG	55	13	03
Marcadores					
			1:1	58	41
Marcadores					
			3:1	45	18
Total				103	59

^aNúmeros correspondentes a identificação da combinação de primer (KOCHER *et al.*, 1998).

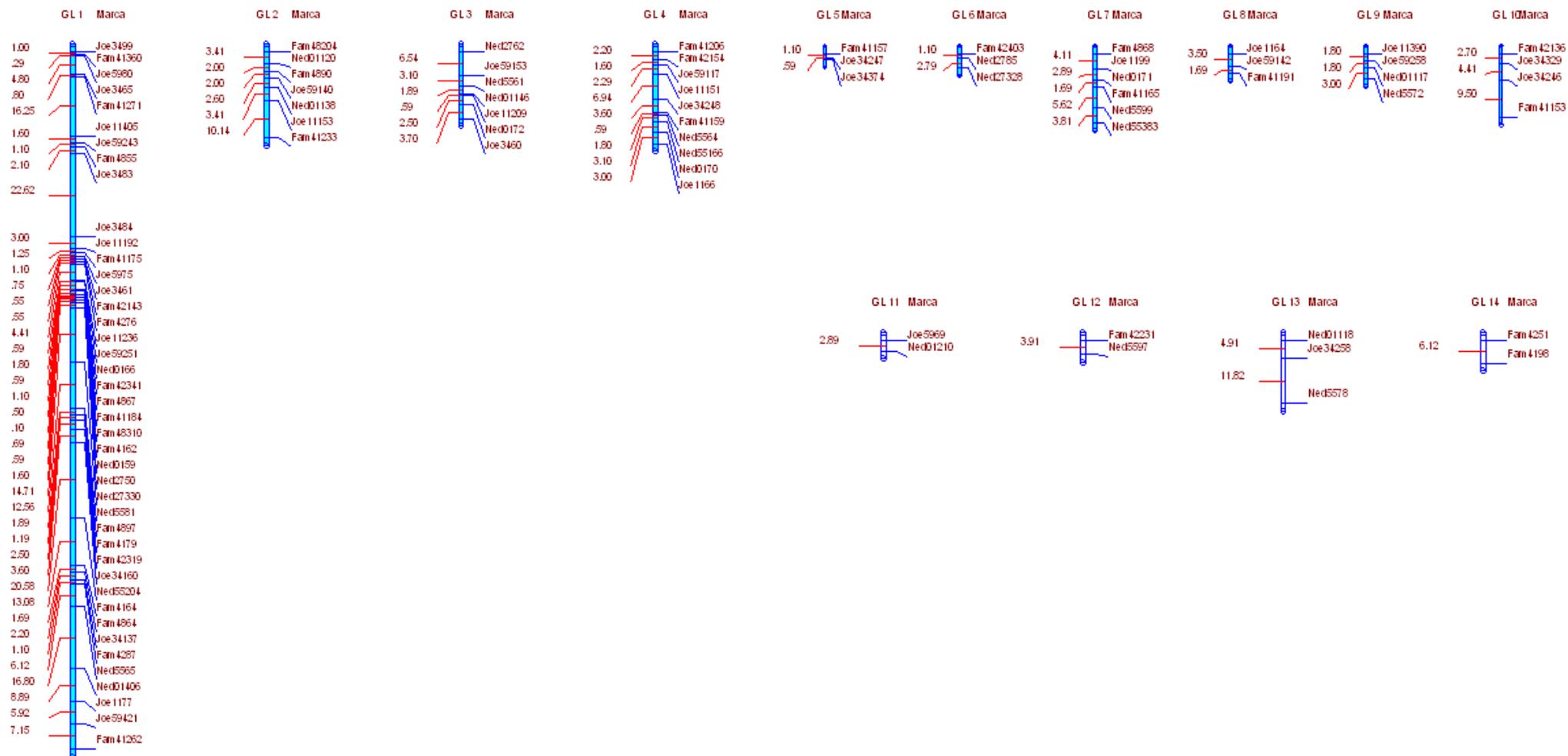


Figura 1. Mapa genético de ligação do camarão marinho *L. vannamei* (família G01). Marcadores AFLP são mostrados no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado no lado esquerdo em cM Kosambi.

4.3. Mapa de ligação para família G2

Os perfis de amplificação obtidos para a população F_2 da família G2 (192 amostras) também apresentaram boa qualidade, sendo possível identificar um total de 188 locos polimórficos dominantes AFLP com variação de tamanhos entre 50 e 500 pares de bases. As combinações de primers que geraram o maior e menor número de locos polimórficos, respectivamente, foram a NED (AAC-CAA) com 34 locos e a NED (ACC-CAG) com 06 locos polimórficos, sendo observado uma média de 20.8 locos polimórficos por combinação de primer. A análise de segregação dos marcadores em caracterizados nesta família também foi testada por meio do teste "qui-quadrado" (χ^2), adotando-se $\alpha=0,01$, no programa GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2001), revelando que, de acordo com a segregação mendeliana esperada, dos 188 locos polimórficos, 41 locos apresentavam segregação mendeliana de 1:1 e 18 locos apresentavam segregação mendeliana de 3:1. A análise revelou que, deste total, 96 e 33 marcadores, respectivamente, exibiam desvio das proporções mendelianas esperadas. Novamente, os locos que apresentavam desvios da segregação mendeliana esperada foram excluídos das análises. A média encontrada para os locos segregantes por primer foi de 6.5, valor estimado para as nove combinações de primers utilizadas, com um total de 59 locos segregantes para esta família (Tabela 2).

Para a construção do mapa de ligação desta família (Figura 2) foram utilizados apenas 59 locos segregantes (41 locos apresentavam segregação mendeliana de 1:1 e 18 locos tinham segregação mendeliana 3:1), resultando

em 4 grupos de ligação, com uma cobertura de 300.73 cM (Kosambi). Foram alocados 42 marcadores (71.18%) nesses grupos de ligação, sendo que o número de marcadores variou de um mínimo de 3 a um máximo de 32 por grupo de ligação. O comprimento dos grupos de ligação variou de 28.46 cM a 183.74 cM. Dos 59 locos segregantes utilizados para a construção deste mapa, 17 locos não foram incluídos em nenhum grupo de ligação.

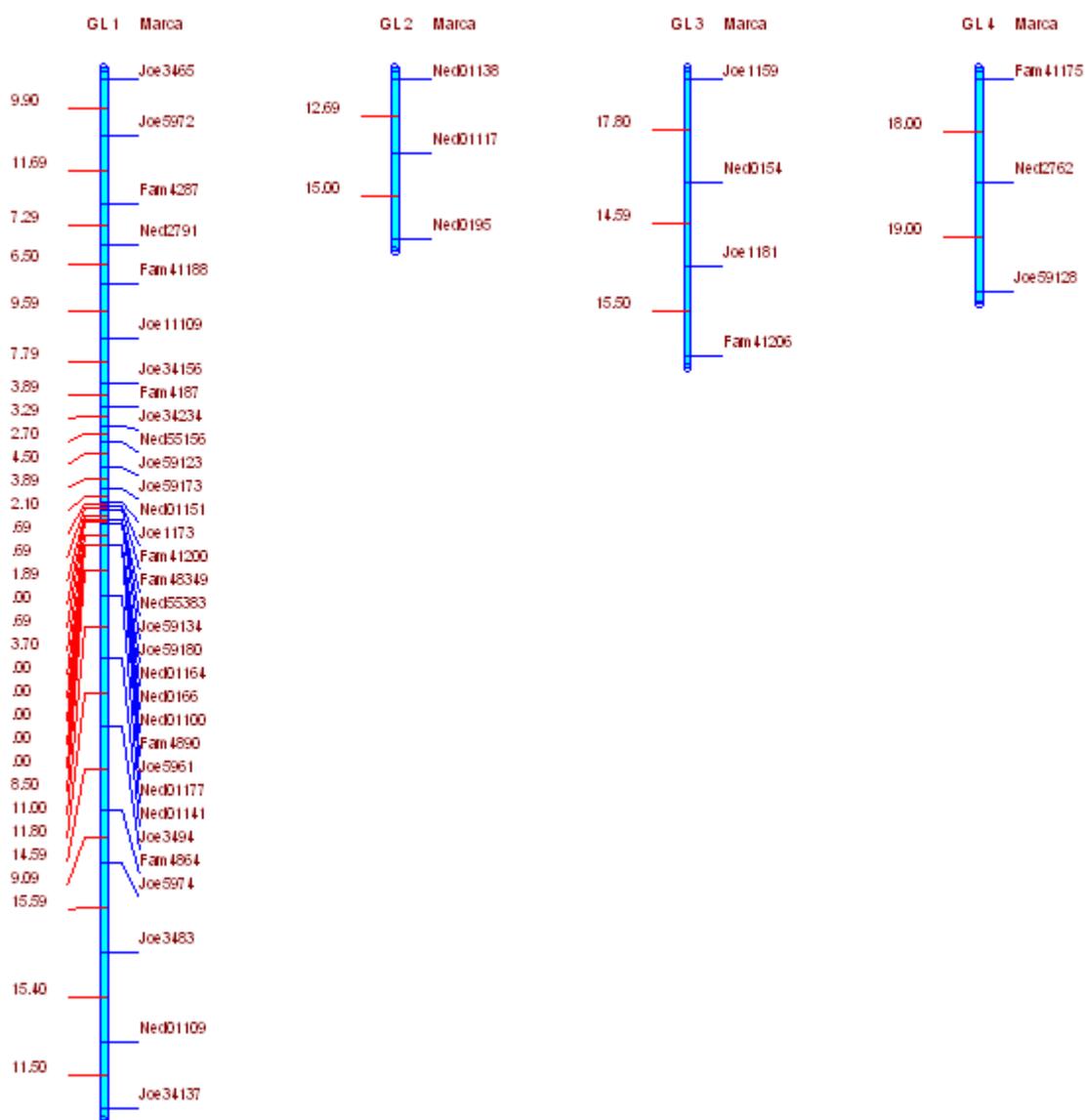


Figura 2. Mapa genético de ligação do camarão marinho *L.vannamei* (família G02). Marcadores AFLP são mostrados no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado no lado esquerdo em cM Kosambi.

4.4. Integração dos mapas (famílias G1 e G2)

Um mapa de ligação integrado grupo 1 (GL1) foi desenvolvido com base nos dados obtidos a partir do primeiro grupo de ligação das duas famílias (G1 e G2) referente aos mapas independentes.

Foi possível encontrar 08 marcas âncoras AFLP nos grupos de ligação de número 01 (GL1) das duas famílias. Após a identificação dos marcadores âncoras AFLP, os mapas foram alinhados, ordenados e integrados, resultando em apenas um grupo de ligação integrado. Foram distribuídos 66 marcadores nesse mapa integrado, o qual evidenciou um grupo de ligação extremamente bem saturado, com uma cobertura do genoma estimada de 874.16 cM, de acordo com a função de Kosambi (Figura 3). A distância estimada entre os marcadores incluídos no mapa integrado variou de 0,01 a 47,12 cM. Marcadores âncoras foram também encontrados em outros cinco grupos de ligação, embora a integração não tenha sido possível porque os critérios de dois marcadores âncoras por grupo de ligação não foi cumprido.

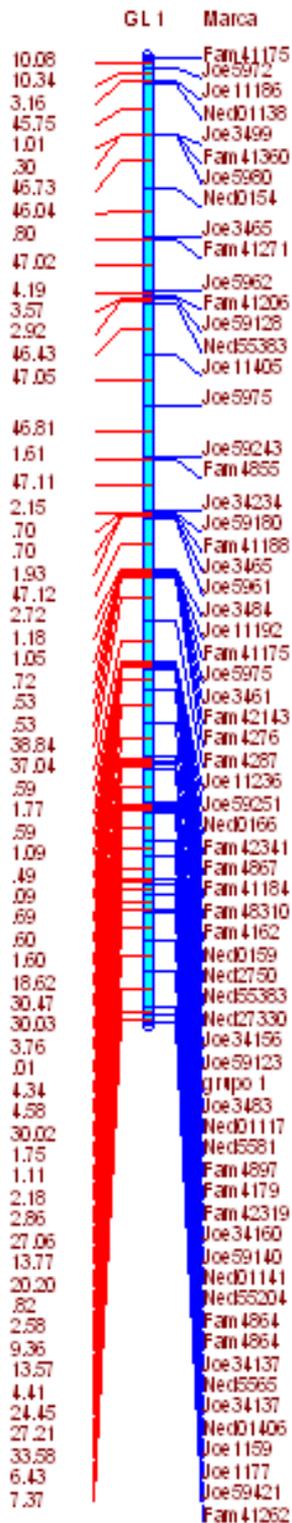


Figura 3. Mapa integrado através de duas famílias, ilustrando a integração de dois grupos de ligação (GL1) referentes a famílias G1 e G2. Marcadores AFLP são mostrados no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores é indicado no lado esquerdo em cM Kosambi.

Discussão

5. Discussão

5.1. Mapa de ligação das famílias G1 e G2

No presente estudo, a partir de uma combinação de 9 conjuntos de primers para AFLP, foram identificadas 270 marcas polimórficas para a família G1. Deste total, 103 locos apresentaram segregação mendeliana e 98 puderam ser utilizadas para o estabelecimento de quatorze grupos de ligação no genoma de *L. vannamei*. Por outro lado, na família G2, análises com as nove combinações de primers, geraram 188 locos polimórficos, onde 59 apresentaram segregação mendeliana e 42 desses marcadores foram ligados em algum grupo de ligação. Estes dados, juntamente com outros estudos, demonstram que a utilização da técnica AFLP pode gerar uma grande quantidade de locos polimórficos, apresentando grande potencial para estudos que envolvam a construção de mapas de ligação (VOS *et al.*, 1995; LIU; CORDES, 2004), incluindo diferentes espécies de camarão (MOORE *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2003; PÉREZ *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2006., ZHANG *et al.*, 2007., STAELENS *et al.*, 2008).

Foi possível encontrar mais de 100 locos polimórficos segregantes na família G1, com proporções mendelianas esperadas, 5 deles não se mostraram ligados à nenhum outro marcador para a construção do mapa genético de *L. vannamei*, não sendo incluídos em qualquer grupo de ligação identificado na família G1. Na família G2 encontramos 59 locos polimórficos segregantes nas proporções de 3:1 e 1:1, onde 42 desses locos foram distribuídos em 4 grupos

de ligação e 17 não foram ligados, não sendo incluídos em nenhum grupo de ligação para o mapa genético de ligação. Para a família G1, 98 locos apresentaram-se úteis para a construção do mapa quando utilizamos a função de Kosambi, que converte a frequência de recombinação dos locos em valores de distância de mapa em centiMorgan (KOSAMBI, 1944).

Um maior número de locos polimórficos foi encontrado na família G1. Apesar dessa família ter sido originada de um parental em geração bastante avançada (F₂₂) (linha Venezuela), o seu cruzamento com um outro parental, de origem distinta (F₇) (linha Panamá) parece ter aumentado a sua variabilidade, o que ocasionou a obtenção de um maior número de locos polimórficos (270) mais satisfatório que aquele obtido na família G2 (188). Este maior número de locos polimórficos observados na família G1 possibilitou a obtenção de um maior número de locos segregantes (103) em relação a família G2 (59) e, conseqüentemente, um maior número de grupos de ligação.

Em geral, os estudos de mapeamento genético em camarão têm relatado uma média de 10 locos polimórficos segregantes por combinação de primer AFLP utilizada (WILSON *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006; STAELENS *et al.*, 2008). PÉREZ *et al.* (2004), no entanto, encontraram uma percentagem menor de bandas polimórficas segregantes para espécie *L. vannamei*, sendo observada uma média de 7,1 locos segregantes por primer. Em contraste ao resultado de Pérez *et al.* (2004), nós conseguimos identificar uma média de 11,4 locos polimórficos segregantes por primer quando consideramos o total de combinações de primers utilizada para a família G1. Na família G2 encontramos uma média um pouco menor, 6,5 locos segregantes por primer. A média dos

locos segregantes por combinação de primer, apresentada pelas duas famílias encontrou-se dentro da média observada para espécies de peneídeos na literatura. O valor referente à família G1 é maior que aquele relatado por Pérez *et al.* (2004) e um pouco menor na família G2 para esta mesma espécie de peneídeo, demonstrando que os dados gerados no presente trabalho são satisfatórios para esta espécie.

Essa diferença observada para o número de locos polimórficos segregantes por combinação de primer entre famílias G1 e G2 pode estar relacionada com a diferente composição dos reprodutores das duas famílias G1 e G2. A menor proporção de locos segregantes na família G2 pode estar relacionada ao fato das linhas Panamá e Equador serem geneticamente mais similares do que as linhas Panamá e Venezuela.

Apesar do elevado número de locos AFLP polimórficos segregantes encontrados, foi observado, no entanto, uma proporção alta de locos com distorção da segregação mendeliana esperada. Entre os 270 locos analisados na família G1, apenas 103 locos encontravam-se na proporção esperada, correspondendo a uma porcentagem de apenas 38% do total de locos polimórficos obtidos. Na família G2, dentre os 188 locos polimórficos, 59 locos encontravam-se na proporção esperada, revelando uma porcentagem de 31% do total de locos polimórficos obtidos.

Distorções da segregação mendeliana esperada em camarões têm sido comumente relatados em estudos que visam à construção de mapas genéticos de ligação (PÉREZ *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; STAELENS *et al.*, 2008). Estudos realizados por Pérez *et al.* (2004) e Zhang *et al.* (2007) na espécie *L.*

vannamei relataram altas taxas de distorção para segregação mendeliana esperada para marcadores AFLP. Zhang *et al* (2007) relataram 2071 bandas polimórficas identificadas para esta espécie de camarão, onde 826 marcas (cerca de 40,5% do total de locos caracterizados) apresentaram desvio da proporção esperada. Neste mesmo estudo, comparativamente, foi observada uma taxa de distorção significativamente menor para os marcadores microsatélites, também utilizados para construção do mapa, o qual apresentou uma proporção de menos de 10% de locos microsatélites com distorção para segregação mendeliana esperada.

Estudos realizados em outras espécies de camarões peneídeos utilizando marcadores moleculares AFLP, no entanto, revelaram desvios da proporção mendeliana menores que aqueles encontrados para *L. vannamei*. Na espécie *M. japonicus* foi encontrada uma taxa de distorção menor que 5% (LI *et al.* 2003), enquanto que na espécie *Fenneropenaeus chinensis*, cerca de 12,2% dos locos estabelecidos apresentaram desvios das proporções esperadas (LI *et al.* 2006).

Fatores que podem influenciar a distorção da segregação mendeliana esperada são os possíveis desvios estatísticos devido ao baixo tamanho da amostragem, erros de genotipagem, amplificação de fragmentos do mesmo tamanho a partir de várias regiões genômicas e fatores de natureza biológica, como a proximidade física de genes que ocupam regiões do genoma relacionadas à formação dos gametas e/ou viabilidade de genótipos após a formação dos zigotos (FARIS *et al.*, 1998; VOGL; XU, 2000; ZHANG *et al.*, 2007). Locos que apresentem desvios de segregação mendeliana devem ser excluídos da construção dos mapas de ligação, uma vez que estes podem

influenciar significativamente nos testes estatísticos utilizados para detectar os grupos de ligação gerando, assim, resultados enviesados (YAO *et al.*, 1999; BEARZOTI, 2000).

Populações de *L. vannamei* utilizadas para construção de mapas de ligação baseados em AFLP e também marcadores microssatélites Zhang *et al.* (2007), encontraram LOD variando de 14 a 17 para marcas microssatélites, enquanto valores em torno de 3 foram considerados adequados para marcas AFLP. Segundo Pérez *et al.* (2004) valores de LOD situados entre 2 e 3 e/ou maiores que 3 para locos AFLP ligados parecem ser comuns. Com base nestes valores de LOD, estes autores conseguiram estabelecer um mapa de ligação com um comprimento total de 2771 cM para o genoma de fêmeas, sendo possível estabelecer 51 grupos de ligação a partir da utilização de 212 marcas segregantes. Deste total, 155 marcas apresentaram $LOD > 3$ e 57 delas apresentaram $2 < LOD < 3$. Uma média de 4,2 marcadores por grupo de ligação estabelecido foi encontrada, sendo observado um mínimo de 2 e máximo de 10 locos por grupo. Neste estudo, os autores encontraram uma média de 55,3 cM para cada grupo de ligação, o qual variou de 0 a 188 cM. A distância estimada entre as marcas utilizadas variou de 0 a 30 cM, sendo que a média observada foi de 17,1 cM. Para machos, a média observada foi menor (15,6 cM), sendo que a distância entre marcadores por grupo de ligação variou de 2 a 30 cM, tendo sido possível estabelecer grupos de ligação com 2 a 159 cM para este sexo. No presente trabalho, o valor do LOD foi 3,0 e a cobertura do genoma estimado foi de aproximadamente 350 cM para G1 e 300 cM para G2.

Se compararmos os valores encontrados neste estudo com a literatura em relação ao tamanho do mapa de ligação encontrado para ambas as famílias parece estar dentro do esperado. Em *Prochilodus argenteus*, Rojas (2008), estabeleceu 9 grupos de ligação, utilizando 15 combinações de primers, o que resultou numa cobertura do genoma de 442,08 cM para esta espécie. Wilson *et al.* (2002), utilizando 23 conjuntos de primers AFLP em *P. monodon*, identificou 673 locos polimórficos, segregantes, sendo possível estabelecer 20 grupos de ligação e uma cobertura de 1412 cM do genoma desta espécie.

Em média os trabalhos de construção de mapas genéticos têm relatado mais de uma centena de locos polimórficos segregantes, obtendo-se dessa maneira um maior número de grupos de ligação (PÉREZ *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; STAELENS *et al.*, 2008). O primeiro mapa de ligação, construído para o camarão *P. japonicus* (MOORE *et al.*, 1999), evidenciou 44 grupos de ligação a partir da obtenção de 246 locos polimórficos segregantes. Para esta mesma espécie Li *et al.* (2003), encontrou um total de 401 locos com segregação 1:1, obtendo 43 grupos para machos e 31 grupos de ligação para fêmeas.

Na espécie *L. vannamei* foram construídos dois mapas de ligação específicos para sexo. Em um deles Pérez *et al.* (2004) encontraram um total de 51 e 47 grupos de ligação para machos e fêmeas, respectivamente, a partir de 394 locos segregantes com proporção 1:1. Em outro estudo, Zhang *et al.* (2007) encontraram 45 grupos de ligação para os dois mapas genéticos específico para cada um dos sexos, onde 642 marcadores segregantes foram estabelecidos para fêmea, e 603 para machos. Para construção desses mapas, cada um dos autores utilizou mais de 100 combinações de primers AFLP (além

dos 30 locos microssatélites utilizados por Zhang *et al.* (2007). Comparativamente aos dados encontrados no presente trabalho, o baixo número de locos polimórficos segregantes em relação à média descrita na literatura, pode justificar o reduzido número de grupos de ligação observado neste estudo.

Apesar de termos encontrado poucos grupos de ligação para a família G2, um dos grupos de ligação (denominado GL1) estabelecidos, apresentou-se bem saturado, apresentando 32 locos segregantes localizados muito próximos um do outro. O mesmo foi observado na família G1 onde foram encontrados 42 locos segregantes e uma média de 7,35 marcadores por grupo. A família G2 uma média de 14,75 marcadores polimórficos segregantes.

Houve uma grande variação entre o número de marcadores observado em cada grupo de ligação estabelecido para cada uma das duas famílias aqui analisadas. Foi observado um mínimo de 2 e um máximo de 42 marcadores por grupo de ligação para a família G1. A distância em cM entre os marcadores variou de 0,1 a 22,62, com uma média próxima a 4,50 cM. Para a família G2 encontramos uma distância entre os marcadores que variou de 0,0 a 15,59 cM. Esta alta proporção de marcadores AFLP concentrados em um mesmo grupo de ligação, provavelmente, contribui para estabelecimento de um menor número de grupos de ligação. Por outro lado, estes dados favorecem estudos que visam identificar QTLs em regiões mais precisas, uma vez que alguns grupos encontram-se saturados, com marcadores bem próximos entre si (DARVASI *et al.*, 1993).

Em *Lycopersicon esculentum*, por exemplo, Grilli *et al.* (2007) também encontraram uma quantidade significativa de marcadores situada em somente um grupo de ligação. Cerca de 30 marcadores AFLP encontrava-se localizado em um mesmo cromossomo, o qual serviu de base para estudos que visavam identificar QTLs em tomates. Desta forma, a caracterização de grupos de ligação saturados com uma grande quantidade de marcadores próximos entre si pode ser uma estratégia interessante para identificar genes de interesse. Neste trabalho, os autores conseguiram uma cobertura de 1191,46 cM, através do estabelecimento de nove grupos de ligação estabelecidos a partir da identificação de 106 marcadores, com segregação 3:1, obtidos da utilização de seis combinações de primers AFLP.

Os resultados aqui apresentados em relação à quantidade de locos segregantes encontrados com apenas 09 combinações de primers foram maiores que aqueles relatados para a espécie *L. vannamei* em outros estudos utilizando marcadores AFLP. O número máximo de marcadores encontrados por grupo de ligação também foi maior. Entretanto, o número de grupos de ligação estabelecido se situou abaixo do esperado, sendo possível cobrir apenas cerca de 350 cM do genoma desta espécie. Por outro lado, se considerarmos, os dados somente do grupo GL1 obtido para as duas famílias, o tamanho desse primeiro grupo de ligação foi de 192.78 cM (família G1) e 183.74 cM (família G2), valor superior a aqueles observados para machos por Pérez *et al.* (2004) (159 cM) e por Zhang *et al.* (2007) (161 cM). Em fêmeas, no entanto, grupos de ligação distantes entre si de 28 a 260 cM puderam ser estabelecidos a partir

da utilização de marcas AFLP combinadas a locos microssatélites (ZHANG *et al.*, 2007).

5.2. Integração dos mapas das famílias G1 e G2

Na literatura poucos trabalhos sobre integração de mapas para camarão têm sido relatados (WILSON *et al.*, 2002; STAELENS *et al.*, 2008). Entretanto, tais mapas podem aumentar potencialmente a estimativa de localização de QTLs e também avaliar possíveis diferenças entre os efeitos dos QTLs estabelecidos em diferentes populações (WALLING *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2005). A análise de QTL realizada com base em uma única população não fornece dados suficientes para estabelecer o comportamento ou efeito deste QTL em populações diferentes. Por outro lado, a análise conjunta com base em mapas integrados pode aumentar o poder de detecção de um QTL e avaliar o seu efeito em diferentes situações (REBAI; GOFFINET 1993; WALLING *et al.*, 2000; BLANC *et al.*, 2006). A integração de mapas em diferentes famílias provenientes de diversos cruzamentos pode ser útil para determinar as posições relativas de transferência de marcas. A fusão de diferentes mapas em um único mapa, com alta densidade de marcas em comum pode facilitar o desenvolvimento de marcadores que estão estreitamente ligados a um QTL ou a genes de interesse.

No presente estudo, houve uma correspondência entre os grupos de ligação GL1 das duas famílias aqui estudadas, com relação à atribuição e à ordenação das marcas neste grupo de ligação. Os grupos homólogos que se integraram foram os que apresentaram o maior número de marcadores polimórficos segregantes, sendo possível encontrar oito marcas âncoras AFLP em comum nesses grupos de ligação.

No entanto, a ausência de marcas âncoras em outros grupos de ligação das famílias G1 e G2, talvez seja devido ao fato das famílias analisadas terem origens diferentes (Panamá x Venezuela e Panamá x Equador), apesar de compartilhar a herança Panamá para metade do genoma. Estas diferenças existentes entre as populações G1 e G2 e também os 17 marcadores não incluídos no mapa da família G2, podem ter resultado em um baixo número de marcas âncoras, diminuindo, desta forma, o número de grupos de ligação obtidos para o mapa integrado. Além disso, o fato da família G2 ter apresentado somente 4 grupos de ligação decorrentes da identificação de poucos locos polimórficos segregantes, também pode ter contribuído para o baixo número de grupos de ligação observado no mapa integrado.

Sendo assim, acreditamos que mapas integrados sejam mais eficientes quando as famílias de referência utilizadas para o cruzamento e obtenção das populações segregantes, possuem origens comuns e apresentam um expressivo conjunto de marcas âncoras, o que não foi possível observar neste trabalho. Em contraste aos resultados aqui apresentados, Wilson *et al.* (2002) encontraram 116 marcadores comuns em populações segregantes F_2 pertencentes a três famílias do camarão *P. monodon* derivadas de cruzamentos entre indivíduos selvagens (G_0). As três famílias foram geradas a partir de indivíduos selvagens, pertencentes à uma mesma população, apresentando desta forma, maior probabilidade de estarem geneticamente relacionados no momento do cruzamento, aumentando a probabilidade de apresentarem um expressivo número de marcas âncoras.

Moore *et al.* (1999) em um estudo realizado em *M. japonicus*, também identificou um número significativo de marcadores AFLP conservados em diferentes famílias. Isso poder estar relacionado ao fato de que essas famílias foram originadas a partir de uma única população (WILSON *et al.*, 2002).

Em um estudo posterior nesta mesma espécie, Li *et al.* (2003) deram continuidade as análises de AFLP referentes as famílias previamente estudadas por Moore *et al.* (1999) o qual chamou de primeiro estágio de mapeamento genético. Neste novo estudo, chamado de segundo estágio de mapeamento seletivo, Li *et al.* (2003) adicionaram mais progênies da mesma família, totalizando 102 progênies, as quais foram genotipadas para 54 combinações de primers. Nos resultados referentes aos dois estágios citados acima, os autores conseguiram um total de 401 marcadores segregantes 1:1, consistindo em 315 marcadores comuns. Para 107 marcadores com segregação de 3:1 encontrados, 75 foram comuns. Esses resultados sugerem que marcadores comuns podem ser facilmente encontrados em famílias compartilhando uma origem comum e também a integração de mapas nestes casos parece ser uma estratégia extremamente eficiente.

Resultados semelhantes ao de Li *et al.* (2003) foram obtidos no estudo de Staelens *et al.* (2008) onde foram identificados 70 marcadores comuns, totalizando 21 grupos de ligação homólogos entre os mapas de macho e fêmea referentes a três famílias de *P. monodon*. Neste estudo a obtenção das famílias também se deu a partir do cruzamento entre parentais pertencentes a uma única população.

No presente estudo, apesar do mapa integrado ter revelado apenas 1 grupo de ligação, o número de locos polimórficos segregantes para este grupo GL1, foi significamente maior do que os obtidos nos mapas independentes das duas famílias. Este grupo integrado servirá para análises futuras de QTLs, uma vez que se encontra intensamente saturado com marcas extremamente próximas entre si. Além disso, os dois mapas independentes das duas famílias podem ser utilizados para investigar a presença de QTLs segregando para cada uma destas famílias. Entretanto, se tais QTLs estiverem segregando em ambas as famílias, o mapa integrado poderá ser mais eficaz para se estudar as diferentes combinações alélicas (MALIEPAARD *et al.*, 1998).

O *framework* dos mapas aqui apresentados pode ser de grande relevância para a atribuição de novas combinações de primers AFLP e alocação de marcadores microssatélites a serem integrados num desses mapas, visando a completa cobertura do genoma desta espécie, especificamente regiões genômicas de interesse econômico. Além disso, a atribuição de novos marcadores microssatélites será extremamente valiosa para o estabelecimento de correspondência entre mapas genéticos de diferentes cruzamentos de populações e para estudos de mapeamento comparativo e evolução (sintenia).

Enfim, as informações obtidas com o presente estudo são importantes para a espécie e deverão fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento genético do camarão marinho *L.vannamei*, visando obter populações mais produtivas e resistentes a doenças.

Conclusões

6. Conclusões

A técnica de fAFLP mostrou-se eficiente para a geração de locos segregantes em *Litopenaeus vannamei* a partir de nove combinações de primers, sendo possível a construção dos mapas de ligação e a integração desses mapas, porém não permitiu cobertura completa.

O *framework* dos mapas aqui apresentados pode ser de grande relevância para a atribuição de novas combinações de primers AFLP e marcadores microsatélites para serem integrados num desses mapas, visando a completa cobertura do genoma desta espécie.

Apesar do mapa integrado ter revelado apenas um grupo de ligação, o número de locos polimórficos segregantes para este grupo GL1, foi significativamente maior do que o obtido nos mapas independentes das duas famílias.

Os dois mapas estabelecidos para as famílias G1 e G2 separadamente podem ser utilizados para investigar a presença de QTLs segregando para cada uma dessas famílias. Se esta análise demonstrar, porém, que tais QTLs, encontram-se segregando em ambas as famílias, o mapa integrado poderá ser mais eficaz para se estudar as diferentes combinações alélicas.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO MARINHO – ABCC.
Projeto executivo para apoio político ao desenvolvimento do camarão marinho cultivado. Recife, 2004.

AFLP PLANT MAPPING PROTOCOL APPLIED BIOSYSTEMS – PE. APPLIED BIOSYSTEMS , 1997. 45 p.

ALJANABI, S.M; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res.**, v. 25 n. 22, p. 4692-4693, 1997.

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

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: Pinheiro, J. B.; Carneiro, I.F. (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas.** Goiânia: FUNAPE, p. 63-224, 2000.

BEAVIS, W.D.; GRANT, D. A linkage map based on information from four F₂ populations of maize (Zea Mays L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, n. 5, p. 636-644, 1991.

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

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY A.; BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo.** Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128 p.

BLANC, G et al. Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 2, p. 206–224, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aqüicultura – DPA. **Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado.** Brasília, 2001. 276 p.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **Programa GQMOL: programa para análise de genética quantitativa e molecular.** Viçosa, 2001.

DALL, W et al. **Advances in marine biology.** Academic Press, 1999.
Academic Press, v. 17, 1999.

DANZMANN R.G.; GHARBI K. Gene mapping in fishes: a means to an end. **Genetica**, v. 111, p. 3-23, 2001.

DARVASI, A et al. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. **Genetics**, v.134, p. 943-951, 1993.

DAVIS, G.P; HETZEL D.J.S. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 3–10, 2000.

DESAI, M. A. et al. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an outbreak of group A streptococcal invasive disease. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 3133-3137, 1998.

DIRLEWANGER, E. et al. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 101, n. 26, p. 9891-9896.

ERLICH, H.A.; GELFAND. D.; SNINSKY. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

FARIS J.D; LADDOMADA B; GILL B.S. Molecular mapping of segregation distortion loci in *Aegilops tauschii*. **Genetics**, v.149, p. 319-327, 1998.

FERREIRA, M.B.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa. p. 220, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, v.137, n.4, p.1121-1137, 1994.

GRILLI, G.V.G.; BRAZ, L.T.; LEMOS, E.G.M. QTL identification for tolerance to fruit set in tomato by FAFLP markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 234-241, 2007.

KOCHER, T.D et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, v. 148, p. 1225-1232, 1998.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.**, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANDER, E.S.; GREEN, P. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 84, p. 2363-2367, 1987.

LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p. 1-37, 2004.

LI, Y. et al. Genetic mapping of the Kuruma *Penaeus japonicus* using AFLP markers. **Aquaculture**, v. 219, p. 143-156, 2003.

LI, R. Combining data from multiple inbred line crosses improves the power and resolution of quantitative trait loci mapping. **Genetics**, v. 169, n. 3, p. 1699–1709, 2005.

LI, Z. et al. AFLP-based genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. **Aquaculture**, v. 261, p. 463-472, 2006.

LUNDIN, M. et al. Cosmid clones from Atlantic salmon: physical genome mapping. **Aquaculture**, v. 177, p. 59-64, 1999.

MALIEPAARD, C. et al. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila Mill*) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 60-73, 1998.

MANIATIS, T.; SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

MOORE, S.S. The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 173, p. 19-32, 1999.

MONTAÑO-PÉREZ, K; VILLALPANDO-CANCHOLA, E; VARGAS-ALBORES, F. Ventajas Del uso de marcadores moleculares em los programas de

mejoramiento genético en camarón. **Panorama Acuícola**, v. 10, n. 1, p. 18-22, 2004.

MONTAÑO-PÉREZ, K., VILLALPANDO-CANCHOLA, E; VARGAS-ALBORES, F. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en acuicultura. **Revista de Ciência y Tecnologia de América**, v. 31, p. 563-569, 2006.

NASCIMENTO, P. A. M. et al. Cultivar camarões: a chance de mitigar os impactos ambientais da pesca. **Panorama da Aqüicultura**, v. 5, p. 19-21, 1995.

PAIVA, I.; ARRAIS, E. Carcinicultura marinha brasileira: realidade e perspective. **Ver da ABCC**, v. 4, p. 6-10, 1997.

PÉREZ, F. A sex-specific linkage map of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* based on AFLP markers. **Aquaculture**, v. 242, p.105-118, 2004.

RAMOS, R. C. Chromosome studies on the marine shrimps *Panaeus vannamei* and *P. californiensis* (Decapoda). **J. Crustac. Biol**, v. 17, p. 666-673, 1997.

REBAI, A.; GOFFINET, B. Power of tests for QTL detection using replicated progenies derived from a diallel cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 1014–1022, 1993.

ROCHA, J. L. et al. Microsatellite-based assessment of genetic diversity and variability in a commercial Brazilian shrimp breeding program. In: AQUACULTURE AMERICA 2005 MEETING. **Proceedings of the Aquaculture America 2005 Meeting**, New Orleans, p. 68.2005.

ROJAS, T. C. G. **Utilização de AFLP para estudos genéticos em *Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae)**. 69 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, 2008.

SAIKI, R. K. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALGADO, C.C. **Integração de mapas genéticos**. 133p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.

STAELENS, J. High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Genetics**, v.179, p. 917-925, 2008.

SUITER, K. A.; J. F. WENDEL.; CASE, J. S.. LINKAGE-1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **J. Hered**, v.74, n. 3, p. 203-204, 1983.

VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, Bethesda, v.155, p.1439-1447, 2000.

VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WALLING, GA. Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies: chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. **Genetics**, v. 155, n. 3, p. 1369–1378, 2000.

WILSON, K. Genetic zapping of the Black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. **Aquaculture**, v. 204, p. 297-309, 2002.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 657-661, 1999.

ZHANG, L. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetica*, v. 131, p. 37-49, 2007.