

CARACTERIZAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Penaeus* DO LITORAL BRASILEIRO ATRAVÉS DE ELETROENFOQUE

D. E. MAGGIONI

Visconde de Cairu 200/701, 60182 -130. Fortaleza - CE, Brasil.

ABSTRACT

Isoelectric focusing is a broadly applied method for identification. Due to its high resolution, the method is able to differentiate even very close species. In this work isoelectric focusing has been used to determinate total protein bands pattern of four different species of *Penaeus* genus (*P. schmitti*, *P. subtilis*, *P. brasiliensis* and *P. paulensis*), all commonly encountered at Brazilian coastal waters. The samples were collected at the coasts of Ceará, Rio Grande do Norte and Rio Grande do Sul states. The individuals morphologically identified as *P. subtilis* presented two different band patterns, attributed to two distinct morphotypes. It has been observed certain similarity between the band pattern of *P. subtilis* morphotype II and that one typically observed for *P. paulensis*, what suggests they both belong to the same species. Jaccard similarity indexes have been calculated from the data obtained, and a dendrogram has been constructed according to UPGMA method.

Keywords: *Penaeus*, shrimp, isoelectric focusing, morphotype, Brazil.

INTRODUÇÃO

O gênero *Penaeus* é mundialmente conhecido por ser o principal crustáceo pescado em vários países. Devido ao grande interesse comercial existente, muitos esforços têm sido dedicados à pesquisa em torno da biologia dos peneídeos (Ringo & Zamora, 1968 ; Pérez Farfante, 1969 ; Brusher & Ogren, 1976 ; Isaac, 1992), tendo sido inclusive muito estudados ao nível genético-bioquímico (Proctor et al., 1974 ; Marvin & Caillouet, 1976 ; Lester, 1979 ; Thomas, 1981 ; Lester & Cook, 1987 ; Bray et al., 1990 ; Sunden & Davis, 1991). No entanto, poucos trabalhos têm sido publicados sobre as espécies *Penaeus subtilis*, *P. schmitti* e *P. brasiliensis*, e o seu estudo genético é ainda inexistente.

Assim como os demais peneídeos essas espécies possuem um ciclo de vida composto de duas fases, uma oceânica e outra estuarina. A fase adulta é marinha com hábitos bentônicos. Desta forma a reprodução ocorre em oceano aberto, com uma fecundação externa, originando ovos demersais cujo tempo de eclosão varia de acordo com a temperatura e espécie (Dall et al., 1990). Durante o desenvolvimento larval, composto pelos estágios de náuplius, protozoéa e mísica, os indivíduos permanecem em ambiente marinho com um hábito planctônico, migrando para as áreas de criadouro ao atingirem a fase de transição, chamada de decapodito (antiga pós-larva). O processo

migratório é complexo, pois envolve deslocamento vertical, movimento de advecção e correntes de marés (Isaac, 1992). Os juvenis retornam para o oceano realizando a primeira desova em poucos meses.

As populações de peneídeos são compostas por uma proporção equilibrada de machos e fêmeas. São indivíduos de hábitos noturnos, permanecendo enterrados no substrato durante o dia. Esses camarões distribuem-se entre 20°N e 20°S em todo o globo com especificidade, devendo-se a grande importância comercial a sua presença na plataforma continental em abundância e à relação cefalotórax-abdômem altamente favorável do ponto de vista de mercado (D'Incao, comunicação pessoal).

A espécie *P. schmitti* Burkenroad, 1936 pertence ao subgênero *Litopenaeus*, e distribui-se desde Cabo Catoche (à cerca de 21° N) na América Central, até Laguna (28°29'S), no Brasil. Podendo ser encontrada tanto nas águas quentes da costa venezuelana como naquelas mais frias do Sul do Brasil (Laguna, SC) (Pérez Farfante, 1969).

A espécie *P. subtilis* Pérez Farfante, 1967 pertence ao subgênero *Farfantepenaeus*, distribui-se desde Cuba, através das Antilhas e de Honduras por todo litoral do Caribe, até Cabo Frio (23°S), no Brasil. Prefere águas mais quentes independentemente da salinidade, pois são eurihalinos, sendo muito encontrados no litoral Norte do Brasil (Pérez Farfante, 1969).

As espécies *P. schmitti* e *P. subtilis* são as espécies de maior interesse comercial encontradas no Norte e Nordeste brasileiro (Ivo & Leite, 1992).

Pertencendo também ao subgênero *Farfantepenaeus* está a espécie *P. brasiliensis* Latreille, 1817. A espécie possui uma mancha característica na junção do terceiro com o quarto somito abdominal a qual é inexistente nas demais espécies que habitam o litoral brasileiro. Sua distribuição vai desde as Bermudas (28°23'N), passando pelas Bahamas e Antilhas, ao longo do litoral da América do Sul até Rio Grande (32°S) - Lagoa dos Patos, Brasil. Apresenta uma preferência por águas mais quentes e assim como os demais peneídeos possui uma alta faixa de tolerância em relação à temperatura (Pérez Farfante, 1969).

Para conhecer melhor as relações fenéticas destas espécies será utilizada a eletroforese. A eletroforese é o método mais utilizado em sistemática bioquímica e refere-se ao movimento de partículas carregadas eletricamente sob a influência de um campo elétrico em um meio suporte. As técnicas eletroforéticas têm sido utilizadas para separar proteínas segundo sua mobilidade relativa num campo elétrico. A migração diferencial é devida à carga elétrica, à conformação e ao peso molecular das proteínas. Os polipeptídeos são a forma mais fácil de identificar o produto molecular dos genes, refletindo as alterações mutacionais do DNA. As proteínas, além do seu grande significado para a compreensão dos processos evolutivos, têm também uma grande importância para a solução de problemas práticos, tanto na sistemática como no estudo da estrutura das populações (Ferguson, 1980).

O eletroênfoque é uma técnica eletroforética que separa e focaliza as proteínas, de acordo com seu ponto isoelétrico. Neste método uma mistura de proteínas é submetida a uma corrente elétrica em um suporte de poliacrilamida

no qual estabeleceu-se inicialmente um gradiente de pH. Cada proteína começa então a migrar em função de sua própria carga elétrica líquida, sendo focalizada na porção do gradiente em que o pH seja igual ao seu pH isoelétrico, formando aí uma faixa estacionária (Mackie, 1973).

Por ser um método relativamente simples, rápido e econômico, o eletroenfoque de proteínas tem sido muito utilizado na identificação de espécies. Lundstrom & Roderik (1979), e Lundstrom (1980 e 1983), se utilizaram deste método para resolver dúvidas na identificação de várias espécies de peixe, devido a sua alta resolução e excelente reprodutibilidade. Segundo Lundstrom (1981) o eletroenfoque é um método que permite que o padrão de bandas de espécimes desconhecidos possa ser identificado através da comparação com o padrão de espécies conhecidas. Mackie (1973 e 1979) e Mackie & Ritchie (1980) utilizaram o eletroenfoque na identificação de várias espécies de pescado, assim como para seus produtos derivados como filés e enlatados. Os autores afirmam que as várias técnicas eletroforéticas são os métodos mais seguros para se identificar espécies quando as diferenças usuais, baseadas na morfologia, são incertas ou sem resultados aparentes. Levy et al. (1983) também utilizaram este método na identificação de filés de pescado, por considerarem a técnica suficientemente sensível para detectar inclusive as pequenas diferenças devidas às variações ontogênicas. Morck et al. (1983) utilizaram esta técnica para identificar ovos de diferentes espécies de peixes marinhos.

O objetivo deste trabalho é determinar o padrão de bandas característico de cada uma das espécies estudadas através do eletroenfoque.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos 100 exemplares em janeiro de 1992 e 109 exemplares em fevereiro de 1993, ambos no mercado público de Fortaleza, CE. Nos manguezais ao redor da Cidade de Natal, RN foram amostrados 106 exemplares, com o auxílio de uma tarrafa, em fevereiro de 1993. E mais cinco indivíduos foram adquiridos no mercado público de Rio Grande, RS em março de 1993. Imediatamente após a coleta os indivíduos foram congelados a -20°C , em sacos plásticos individuais.

A análise morfométrica preliminar foi realizada no Laboratório de Carcinologia da Fundação Universidade do Rio Grande segundo Pérez Farfante (1969), onde os exemplares foram identificados como *Penaeus subtilis*, *P. schmitti* e *P. brasiliensis* nas amostras de Fortaleza e Natal, e *P. paulensis* na amostra de Rio Grande.

Foi retirado um pequeno pedaço de músculo do quinto segmento abdominal de cada um dos indivíduos estudados, o qual foi homogenizado, através de maceração com bastão de vidro, com tampão Tris HCl 0,2 M pH 7,5, em tubos Eppendorf. Após a homogeneização os extratos foram armazenados até o dia seguinte, a -80°C . Antes do início da corrida os extratos foram centrifugados em microcentrífuga a 14000 rpm por 10 minutos. No total foram analisados 10

indivíduos de cada espécie para cada uma das áreas de coleta da região Nordeste e mais os cinco exemplares coletados em Rio Grande.

Foram utilizados géis de poliacrilamida horizontal (0.8 mm de espessura) os quais foram preparados segundo o procedimento descrito por Levy et al. (1983). A variação do gradiente de pH nos géis é determinada pelos anfolitos (Pharmacia Chemical CO.). Foram testados os anfolitos com pH 2,5-5,0, 5,0-8,0, 3,0-10,0. Os tampões utilizados como pontes para cada tipo de anfolito foram H₂SO₄ 0.1 M e NaOH 0.1 M, ác. Glutâmico 0.04 M e NaOH 0.1 M, e H₃PO₄ 0.1 M e NaOH 0.1 M, respectivamente, segundo o recomendado pelo fabricante. Após a centrifugação, a aplicação dos extratos foi feita a 1 cm do cátodo e, com o auxílio de um aplicador, foram semeados aproximadamente 5 ml de extrato.

O gel foi colocado em uma cuba eletroforética, adaptando-se pontes de papel filtro Whatman 1 às suas bordas, as quais fazem a ligação dos tampões com o gel. A corrida foi realizada a uma potência constante de 4 W, iniciando-se com 220 V e 30 mA. O final da corrida é determinado pela amperagem, quando esta chega a zero. O tempo de duração da corrida variou entre uma hora e meia e duas horas.

Terminada a corrida o gel foi retirado da cuba e colocado em uma bandeja com TCA 5% por 30 minutos para a fixação das proteínas. Logo após este período o gel foi lavado com solução descolorante de metanol, água destilada e ácido acético na proporção de 5:5:1 por 5 minutos, a fim de eliminar o excesso de TCA. Retirada a solução descolorante, o gel foi corado com uma solução de Comassie Blue 0,1% por 20 minutos a 80 °C. Após este período o gel foi novamente lavado com a mesma solução descolorante descrita acima, deixando-se descorar por, pelo menos, duas horas, para a visualização dos padrões de bandas.

Para sua preservação, o gel foi colocado em ác. acético por 5 minutos. Depois o gel foi colocado em uma solução de Glicerol 5% por 20 minutos juntamente com uma folha de papel celofane. O gel foi então embalado com o celofane e preso a uma placa de vidro para evitar que dobrasse, e seco em condições ambientes (Numachi, 1981).

A fim de quantificar as diferenças observadas entre os padrões foi calculado o índice de similaridade de Jaccard, cujo valor corresponde à quantidade de bandas em comum em relação ao total, para as espécies comparadas aos pares. A partir da matriz de similaridade obtida foi criado um dendrograma pelo método UPGMA. Estes procedimentos seguiram o descrito por Romesburg (1984).

RESULTADOS

Dos 3 diferentes tipos de anfolitos testados, apenas os géis com faixa de pH 3-10 apresentaram uma boa resolução. Só foram analisados os géis com esse gradiente de pH. Não foi observado nenhuma variação nos padrões de

proteínas devido ao tamanho ou ao sexo para nenhuma das espécies estudadas.

A Figura 1 apresenta o padrão de eletroenfoque de proteínas totais de quatro espécies do gênero *Penaeus*. O padrão de bandas de cada espécie foi único, podendo-se diferenciar facilmente os indivíduos de cada espécie (*P. subtilis*, *P. schmitti*, *P. brasiliensis* e *P. paulensis*).

Nos testes observou-se a presença de dois padrões diferentes nos exemplares morfologicamente identificados como *P. subtilis*, tanto para a região de Natal como para a de Fortaleza. Foram então feitas comparações de padrões de eletroenfoque com outras espécies do mesmo gênero, onde observou-se uma igualdade entre o padrão de bandas de alguns exemplares inicialmente considerados como pertencentes à espécie *P. subtilis*, os quais apresentavam um padrão diferenciado, e o padrão de bandas característico da espécie *P. paulensis* obtida no Rio Grande do Sul (Figura 1).

Os valores do índice de similaridade de Jaccard obtidos a partir da comparação entre os padrões de bandas estão apresentados na Tabela 1, e o dendrograma resultante, na Figura 2. O coeficiente de correlação cofenética de Pearson correspondente foi de 0,989, indicando que, ao construir o dendrograma, praticamente não houve distorção da informação apresentada na matriz de similaridade.

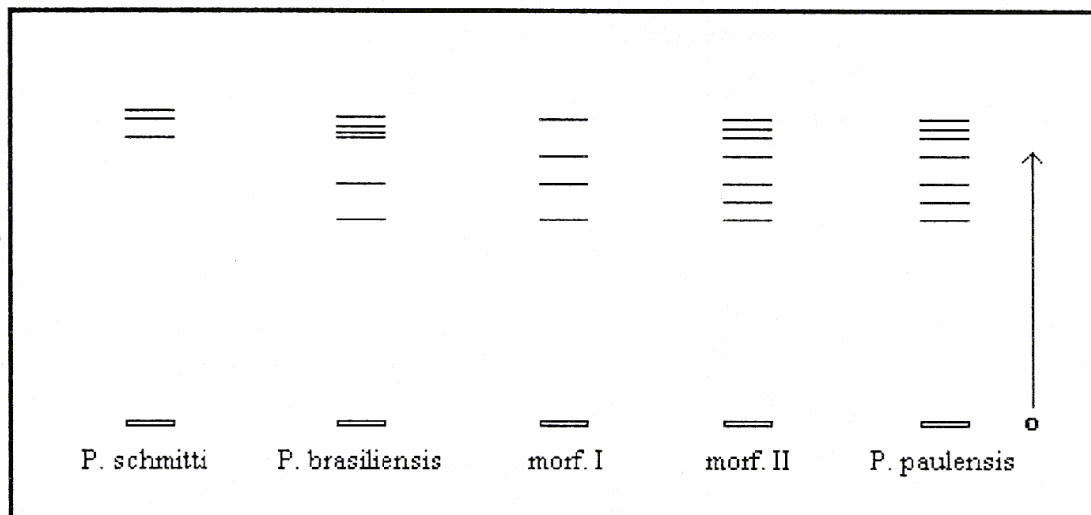


Figura 1. Padrões de proteínas totais para os peneídeos estudados

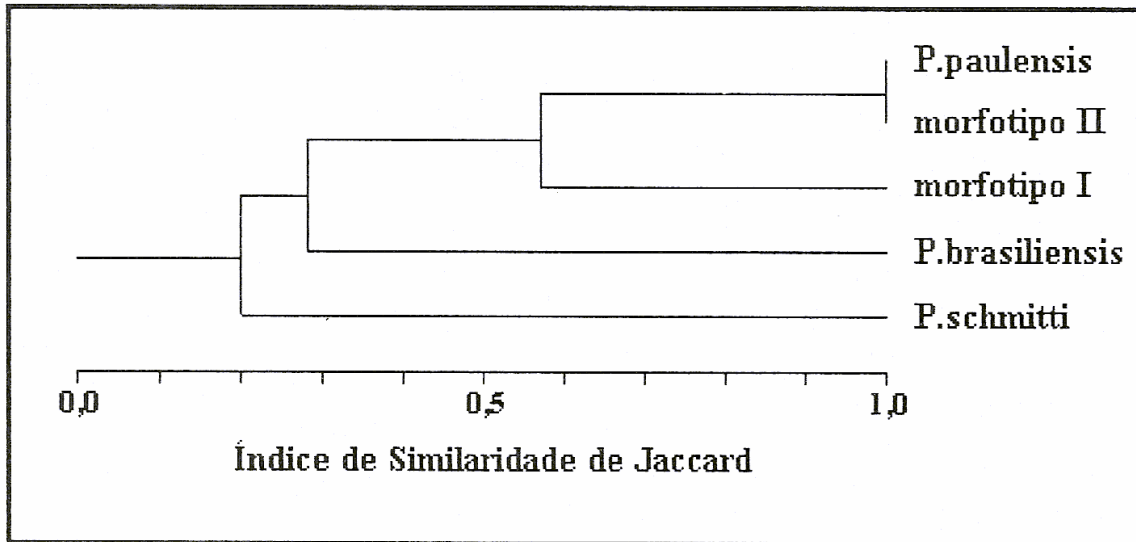


Figura 2. Dendrograma obtido a partir dos índices de similaridade de Jaccard.

Tabela 1. Índices de similaridade de Jaccard

	<i>P. schmitti</i>	<i>P. brasiliensis</i>	morfotipo I	morfotipo II	<i>P. paulensis</i>
<i>P. schmitti</i>	-	0,125	0,167	0,250	0,250
<i>P. brasiliensis</i>	-	-	0,250	0,300	0,300
morfotipo I	-	-	-	0,571	0,571
morfotipo II	-	-	-	-	1,000
<i>P. paulensis</i>	-	-	-	-	-

DISCUSSÃO

O presente estudo determinou o padrão de eletroenfoque de proteínas totais de 4 espécies do gênero *Penaeus* existentes no litoral brasileiro. O padrão de bandas foi característico e específico, repetindo-se entre os indivíduos da mesma espécie (Fig. 1).

As espécies *P. schmitti* e *P. brasiliensis* apresentaram padrões de bandas típicos entre todos os indivíduos testados, conforme o esperado. O resultado do eletroenfoque feito com a espécie *P. subtilis* apresentou dois padrões de bandas distintos. A partir deste resultado estes exemplares foram separados em morfotipo I e morfotipo II. Como morfotipo I foram classificados aqueles exemplares cujas características morfológicas estavam de acordo com aquelas de um *P. subtilis* típico segundo Pérez Farfante (1967). Como morfotipo II foram classificados os demais indivíduos cujas características morfológicas se apresentavam um pouco distintas do morfotipo I. Este

resultado induziu à hipótese de que os exemplares do morfotipo II pudessem pertencer a uma outra espécie ainda não descrita para esta região. Assim sendo, foram então realizados vários testes de comparação entre o morfotipo II e outros peneídeos do litoral brasileiro. Observou-se então uma identidade no padrão destes indivíduos com aquele de exemplares da espécie *P. paulensis*, o que sugere que possam ser indivíduos da mesma espécie. Como pode ser observado a partir da análise da matriz de similaridade (Tabela 1) e do dendrograma (Figura 2) não houve diferenças detectáveis. Além disso, apesar de os dados de eletroenfoque não permitirem inferências a respeito do grau de identidade genética entre os organismos, os agrupamentos apresentados no dendrograma estão de acordo com a literatura corrente no que se refere às relações taxonômicas entre as espécies do gênero *Penaeus*.

A espécie *P. paulensis* foi descrita por Pérez Farfante em 1967 a qual determinou que sua área de distribuição estende-se desde o Sul de Cabo Frio, ao longo do litoral Sudeste brasileiro, até o Uruguai, no máximo até o Norte da Argentina. Pertencendo também ao subgênero *Melicertus*, esta espécie é um parente muito próximo da espécie *P. subtilis*. Essas duas espécies podem ser diferenciadas por algumas características morfológicas, as quais muitas vezes são confusas podendo ocasionar erros na identificação.

A presença da espécie *P. paulensis* no litoral Nordeste brasileiro não é um fato inédito, pois Burkenroad (1939) ao determinar a existência de três morfotipos da espécie *P. aztecus* ao longo da sua área de distribuição, afirmou ter encontrado, no litoral de Pernambuco, um exemplar do morfotipo C, atualmente conhecido como *P. paulensis*. Do mesmo modo, Pérez Farfante (1967) ao descrever a espécie *P. subtilis* cita ter encontrado, no extremo Oeste do Ceará, uma população com características um pouco distintas daquelas comumente encontradas para esta espécie. Contudo, a análise de tais características levou à conclusão de que se tratavam de duas populações de *P. subtilis*.

Considerando que a maioria das espécies do gênero *Penaeus* são espécies tipicamente tropicais, é possível sugerir que a espécie *P. paulensis* tenha uma ampla distribuição no litoral brasileiro e tenha sofrido adaptações em consonância com as diversas características ambientais. Assim sendo, torna-se necessária a realização de um estudo mais detalhado para estabelecer o status taxonômico dos dois morfotipos de *P. subtilis*, utilizando técnicas de genética-bioquímica. Caso fique estabelecido que esses dois morfotipos sejam duas espécies diferentes, e que o morfotipo II realmente pertença à espécie *P. paulensis*, torna-se então necessária a realização de um estudo de genética populacional ao longo de toda a área de distribuição desta espécie.

Os resultados destas pesquisas irão auxiliar não só no ajuste do manejo pesqueiro deste recurso, como também em questões relacionadas com o cultivo desta espécie, como por exemplo o melhoramento genético e a adequada seleção de um estoque reprodutor. O conhecimento da estrutura genética de uma população ao longo de toda a sua área de distribuição, permite que se mantenha a maior variabilidade genética possível dentro de um

cultivo, a partir de uma amostragem bem distribuída com uma ampla base genética (Sunden & Davis, 1991).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. J.A. Levy pela orientação e apoio durante todas as fases deste trabalho. Às instituições de apoio à pesquisa, CNPq e FAPERGS, pelas bolsas concedidas. À EMPARN pelo fornecimento das amostras do Rio Grande do Norte. Ao Prof. F. D'Incao pela coorientação e amizade. Ao meu marido Rodrigo Maggioni por estar sempre próximo me apoiando e orientando desde a idéia até a conclusão deste trabalho. A amiga Fernanda Hoefel pela gentil colaboração na preparação do abstract. A toda equipe do Laboratório de Bioquímica Marinha pelas críticas positivas e pelo companherismo.

REFERÊNCIAS

- BRAY, W.A., A.L. LAWRENCE, L.J. LESTER E L.L. SMITH. 1990. Hybridization of *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1967) and *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology*, 10(2): 278-283.
- BRUSHER, H.A. e L.H. OGREN. 1976. Distribution, abundance, and size of Penaeid Shrimps in the St. Andrew Bay Sistem, Florida. *Fishery Bulletin*, 74(1): 158-166.
- BURKENROAD, M.D. 1939. Further observations on Penaeidae of the northern Gulf of Mexico. *Bull. Bingham Oceanografic. Collect.*, 6(6): 1-62.
- DALL, W., B.J. HILL, P.C. ROTHLSBERG e D.J. STAPLES. 1990. *Advances in Marine Biology*, Vol 27: The Biology of the Penaeidae. Academic Press, London, 489pp.
- FERGUSON, A.B. 1980. *Biochemycal Systematics and Evolution*. Blackie and Son, Glasgow and London, 194pp.
- ISAAC, V.J., J.D. NETO e F.G. DAMASCENO. 1992. Biologia, dinâmica e administração pesqueira do camarão rosa *Penaeus subtilis* da costa norte do Brasil. IBAMA, Proteção ao Meio Ambiente. Série Estudos Pesca no. 1, 187 pp.
- IVO, C.T.C. e J.G. LEITE. 1992. Considerações sobre a amostragem do camarão-rosa, *P. (Farfantepenaeus) subtilis* Pérez Farfante, 1967, e do camarão-branco, *P. (Litopenaeus) schmitti* Burkenroad, 1936, capturados no Norte e Nordeste do Brasil. *Boletim de Ciências do Mar* no 49.
- LESTER, L.J. 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *The Journal of Heredity*, 70: 175-180.
- LESTER, L.J. e J.P. COOK. 1987. Ontogenic changes in isozyme patterns of *Penaeus* species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B(2): 253-258
- LEVY, J.A., J.S. YUNES e B. BALDISSEROTO. 1983. Identificação de filés de pescado através de eletroenfoque. *Boletim informativo DIPES*. Editora Tipogresso BSB, 39pp.
- LUNDSTROM, R.C. 1980. Fish species identification by thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(1): 69-73.
- LUNDSTROM, R.C. 1981. Rapid fish species identification by agarose gel isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. *J. AOAC*, 64(1): 38-43.

- LUNDSTROM, R.C. 1983. Identification of Pacific Rockfish (*Sebastes*) species by ISF. J. AOAC, 66(4): 974-980.
- LUNDSTROM, R.C. e S.A. RODERICK. 1979. Fish - Species identification by Thin Layer Isoelectric Focusing of sarcoplasmatic proteins. Science Tools, 26(3): 38-43.
- MACKIE, I.M. 1973. Identifying Fish: A chemical method. Torry Advisory note no. 59, 1-9.
- MACKIE, I.M. 1979. A review of some recent application of electrophoresis and iso-electric focusing in the identification of species of fish in fish and fish products. In Advances in Fish Science and Tecnology (J.J. Conell, Ed.). Fishing New Books, Farnham, England.
- MACKIE, I.M. e H. RICHIE. 1980. Differentiation of Atlantic Cod *Gadus morhua morhua* and Pacific Cod *Gadus morhua macrocephalus* by electrophoresis and ISF of water soluble proteins of mussel tissue. Comp. Biochem. Physiol., 68b: 173-175.
- MARVIN, K.T. e C.W. CAILLOUET. 1976. Phosphoglucomutase polymorphism in white shrimp, *Penaeus setiferus*. Comp. Biochem. Physiol., 53B: 127-131.
- MORCK, J., P. SOLEMDAL e G. SUNDNES. 1983. Identification of marine fish eggs: a biochemical genetics approach. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40: 361-369.
- NUMACHI, K. 1981. Sample method for preservation and scanning of starch gel. Biochemical Genetic, 19: 233-236.
- PÉREZ FARFANTE, I. 1967. A new species and a new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from the western Atlantic. Proc. Biol. Soc. Wash., 80: 83-99.
- PÉREZ FARFANTE, I. 1969. Wersten Atlantic Shrimp of Genus *Penaeus*. Fishery Bulletin, 67(3): 461- 591.
- PROCTOR, R.R., K.T. MARVIN, L.M. LANSFORD e R.C. BENTON. 1974. Phosphoglucomutase in brown shrimp, *Penaeus astecus*. J. Fish. Res. Board Can., 31(8): 1405-1047.
- RINGO, R.D. e G. ZAMORA Jr. 1968. A Penaeid postlarval character of taxonomic value. Bulletin of Marine Science, 18(2): 471- 476.
- ROMESBURG, H.C. 1984. Cluster Analysis for Researchers. Wadsworth, Belmont, 334 pp.
- SUNDEN, S.L.F. e S.K. DAVIS. 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. Aquaculture, 97: 131-142.
- THOMAS, M.M. 1981. Preliminary results of electrophoretic studies on marine prawns. Indian Journal of Fisheries, 28(1-2): 292- 294.