

EVIDÊNCIA GENÉTICA DA PRESENÇA DE *Farfantepenaeus paulensis* (PÉREZ FARFANTE, 1967) NO LITORAL NORDESTE DO BRASIL (DECAPODA: PENAEIDAE).

F. D'INCAO; G. DELEVEDOVE; D. E. MAGGIONI & R. MAGGIONI

Laboratório de Crustáceos Decápodos - Depto. Oceanografia - FURG - C.Postal 474 - 96201-900
- Rio Grande - RS - Brasil
E-mail : docdinca@super.furg.br - glaucod@bigfoot.com

ABSTRACT

Northeastern and southern (Ceará and Rio Grande do Sul) Brazilian shrimps were sampled. The species identification was made using morphological and isoelectric focusing methods. Twenty one shrimps of the *Farfantepenaeus subtilis* species, 19 shrimps of the morphotype II and 14 shrimps of the *F. paulensis* species were analyzed by isozyme electrophoresis. Eighteen loci and 33 alleles were identified. The allelic frequencies values and Wright's fixation index (F) suggest that morphotype II is an equatorial subpopulation of *F. paulensis*.

Keywords: *Farfantepenaeus*, isozyme electrophoresis, distribution.

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Farfantepenaeus* são importantes estoques pesqueiros. A pesca ocorre na costa do Brasil, norte da América do Sul, América Central, Caribe e América do Norte. As espécies deste gênero pertenciam ao gênero *Penaeus*. Burukovski (1997) criou o gênero *Farfantepenaeus* para algumas espécies do Atlântico entre as quais *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez Farfante, 1967) e *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967).

A importância econômica destas espécies e a necessidade de administração dos recursos, determinaram que muitas pesquisas fossem realizadas sobre a biologia, ecologia e sistemática (Pérez Farfante, 1967, 1969; D'Incao, 1984, 1990, 1991; Dall *et al.*, 1990; Valentini *et al.* 1991; Isaac *et al.* 1992; Pérez Farfante & Kensley, 1997). *F. subtilis* é uma das espécies mais importantes no cultivo de camarões em cativeiro da costa nordeste do Brasil onde desenvolvem-se estudos sobre a metodologia de cultivo, envolvendo desde a reprodução até o processo de vendas (Rocha *et al.*, 1989). No outro extremo do país, na costa Sudeste-Sul, a espécie *F. paulensis* tem importância equivalente.

A obtenção de informações genéticas, através de técnicas de biologia molecular, tem sido usadas como um recurso valioso na resolução de problemas de sistemática e identificação de populações (Proctor *et al.*, 1974; Marvin & Caillouet, 1976; Lester, 1979; Thomas, 1981; Lester & Cook, 1987; Bray, *et al.*, 1990; Sunden & Davis, 1991).

F. subtilis distribui-se pelo litoral do Caribe, desde Cuba e Honduras, e na América do Sul até Cabo Frio (23°S), Brasil. *F. paulensis* distribui-se no litoral da América do Sul desde Ilhéus, Bahia até o Uruguai, com algumas ocorrências no norte da Argentina (D'Incao, 1995). As espécies são morfologicamente bastante semelhantes, sendo

consideradas, até 1967, da mesma espécie (*Penaeus aztecus*). Burkenroad (1939) determinou a existência de três morfotipos desta espécie ao longo de sua área de distribuição. Pérez Farfante (1967, 1969) criou as espécies *F. subtilis* e *F. paulensis* para dois destes morfotipos.

O estudo das relações fenéticas de quatro espécies de peneídeos utilizando o eletroenfoque, uma técnica bioquímica onde as proteínas são separadas e focalizadas de acordo com seu ponto isoelétrico, mostrou dois padrões distintos de bandas para *F. subtilis*, coletados no litoral de Fortaleza, Ceará. O padrão atribuído ao morfotipo II demonstrou ser similar ao de exemplares da espécie *F. paulensis* coletados na Lagoa dos Patos, no sul do Brasil (Maggioni, 1996).

Nas últimas décadas a introdução de novas técnicas bioquímicas produziram grande quantidade de informações sobre a variabilidade genética e a evolução molecular, grande parte delas através da eletroforese de isoenzimas (Nei, 1987). Esta técnica tem sido usada para separar proteínas de acordo com sua mobilidade relativa em um gel, causada por um campo elétrico. Todas as proteínas possuem uma carga elétrica líquida, a qual é determinada, principalmente, pela sua estrutura primária (seqüência de aminoácidos) e pelo pH do meio em que se encontram. A sua mobilidade eletroforética é usada como indicador de similaridade na composição de aminoácidos. Quando revelados através de técnicas que permitem a identificação específica dos tipos enzimáticos, pode-se chegar a uma interpretação genética dos padrões obtidos, uma vez que cada enzima ou proteína é o produto de um locus e suas variações representam diferentes alelos (Brewer, 1970; Harris & Hopkinson, 1977). Além da sua importância para a compreensão dos processos evolutivos, as proteínas também são utilizadas na resolução de problemas práticos, tanto em sistemática como no estudo da estrutura das populações (Ferguson, 1980).

Este trabalho tem por objetivo avaliar o status taxonômico dos exemplares identificados como morfotipo II em relação as espécies *F. subtilis* e *F. paulensis*, através dos dados genéticos fornecidos pela eletroforese de isoenzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas em dois pontos do litoral brasileiro. A primeira amostra composta de 46 exemplares foi obtida em Fortaleza, Ceará, (janeiro/1993). Os indivíduos foram congelados imediatamente após a coleta e remetidos para o Laboratório de Crustáceos Decápodos da Fundação Universidade do Rio Grande. A segunda amostra foi obtida no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande (março/1993).

Os exemplares foram identificados com base em suas características morfológicas, obtendo-se da amostra de Fortaleza 14 exemplares pertencentes à espécie *F. subtilis* e 26 considerados como pertencentes ao morfotipo II de Maggioni (1996). A amostra da Lagoa dos Patos estava constituída por 14 exemplares da espécie *F. paulensis*. Estes 54 exemplares foram considerados como a amostra a ser submetida à eletroforese.

A identificação morfológica dos indivíduos foi testada através de eletroenfoque em gel de poliacrilamida horizontal, pH 3-10 estabelecido com o uso de Ampholyte (Pharmacia Chemical Co.). Como pontes foram utilizados H_3PO_4 0,1M no ânodo e NaOH 0,1M no cátodo, seguindo o recomendado pelo fabricante dos anfólitos. Os procedimentos de fixação e coloração dos géis segue o descrito por Lundstrom (1980) e Levy *et al.* (1983). Os géis foram preservados de acordo com Numachi (1981).

Os testes eletroforéticos foram realizados usando amostras de hepatopâncreas e músculo abdominal. A carapaça, apêndices e estruturas sexuais externas foram preservados para estudos posteriores de morfologia. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 0,5 ml de tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 7,5) e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos para obtenção do sobrenadante.

A separação eletroforética foi realizada utilizando-se como suporte gel de amido 14% (Penetrose 30). Os tampões e condições de corrida foram definidos em estudo prévio (Delevedove, 1996) onde foram testados 22 sistemas enzimáticos. A sua denominação, bem como a dos loci e alelos, seguem o sugerido por Shaklee *et al.* (1990). Sete sistemas não produziram padrões interpretáveis, e os 15 sistemas restantes, juntamente com as condições de corrida nas quais foram melhor resolvidos, estão apresentados na Tabela 1. A corrida eletroforética e a revelação de isoenzimas foram realizadas de acordo com a literatura (Shaw & Prasad, 1970; Redfield & Saline, 1980; Aebersold *et al.*, 1987; Shaklee & Keenan, 1986).

Os padrões de bandas foram interpretados geneticamente e analisados através do programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1981). Foram calculadas as frequências alélicas para cada locus, polimorfismo (considerando polimórfico o locus que apresentou mais de um alelo), heterozigiosidade média (estimativa não viciada de Nei, 1978) e o ajuste ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, através do teste de qui-quadrado, usando a correção para pequenas amostras proposta por Levene (1949 apud Nei, 1987). As diferenças observadas entre as populações foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado através de tabelas de contingência e pela estatística do índice de fixação F (Wright, 1965). Foram calculados ainda os índices de identidade e distância genética de Nei (1978) e construído um dendograma a partir da matriz de similaridade, pelo método UPGMA.

Tabela 1. Sistemas que produziram resultados interpretáveis. Tampão: TCLiB, tris-citrato-lítio-borato, pH 8,3-8,26 (Redfield & Salini, 1980); TCE8, tris-citrato-EDTA, pH 8,0 (Siciliano & Shaw, 1976); TCD, tris-citrato descontinuo, pH 6,0-5,1 (Guiñez & Galleguillos, 1986); TCE7, tris-citrato-EDTA, pH 7,0 (Shaw & Prasad, 1970). Tecido: h, hepatopâncreas; m, músculo abdominal. Abreviatura: abr.

Sistema enzimático	abr.	E.C.	condição	tampão	tecido
Aldeído Oxidase	AO	1.2.3.1	7W/4h	TCLiB	h
Enzima Málica	MEP	1.1.1.40	6W/5h	TCE8	m
Esterases	EST	3.1.1.-	7W/4h	TCLiB	h
Fosfatase Alcalina	ALP	3.1.3.1	7W/4h	TCLiB	h
Fosfogluconato Desidrogenase	PGDH	1.1.1.44	6W/5h	TCD	m
Frutose Bifosfato Aldolase	FBALD	4.1.2.13	4,5W/5h	TCE8	m
Glicerol 3-Fosfato Desidrogenase	G3PDH	1.1.1.8	4,5W/5h	TCE8	m
Glucose 6-Fosfato Isomerase	GPI	5.3.1.9	7W/5h	TCE7	m
Hexokinase	HK	2.7.1.1	7W/5h	TCE7	m
Isocitrato Desidrogenase	IDHP	1.1.1.42	4,5W/5h	TCE8	m
Lactato Desidrogenase	LDH	1.1.1.27	6W/5h	TCD	m
Malato Desidrogenase	MDH	1.1.1.37	4,5W/5h	TCD	m
Manose Fosfato Isomerase	MPI	5.3.1.8	7W/5h	TCE7	m
Peptidases	PEP	3.4.-.-	7W/4h	TCLiB	h

RESULTADOS

No eletroenfoque preliminar, sete dos 26 indivíduos inicialmente identificados como morfotipo II mostraram padrões típicos de *F. subtilis* e foram considerados como tal na análise subsequente. Portanto a amostra de *F. subtilis* passou a ser constituída de 21 exemplares, e a de morfotipo II de 19.

Os 15 sistemas interpretados forneceram informação sobre 18 loci e 33 alelos. Os loci MDH-1, LDH, MEP, G3PDH, FBALD, HK, ALP, AO, PEP, EST-1, EST-2 e EST-3 apresentaram-se monomórficos e fixados para o mesmo alelo nos três grupos considerados. A freqüência alélica dos demais loci está apresentada na Tabela 2, juntamente com o polimorfismo e heteroziguidade na amostra estudada. Pode-se observar nessa tabela que no locus PGDH o morfotipo II e *F. subtilis* não possuem alelos em comum.

Tabela 2. Frequências alélicas nos loci interpretados. N - tamanho amostral; P - polimorfismo observado considerando polimórficos os loci com mais de um alelo; H_o - heteroziguidade média observada; H_e - heteroziguidade média esperada, estimativa não tendenciosa (Nei, 1978)

Locus	alelo	<i>F. paulensis</i> (14)	morfotipo II (19)	<i>F. subtilis</i> (21)
PGM	A	.036	-	-
	B	-	.026	.095
	C	.964	.974	.881
	D	-	-	.024
PGDH	A	-	-	.976
	B	-	-	.024
	C	.036	.526	-
	D	.964	.447	-
	E	-	.026	-
GPI	A	1.000	.895	.452
	B	-	.105	.548
IDHP	A	.964	1.000	1.000
	B	.036	-	-
MDH-2	A	.964	1.000	.976
	B	-	-	.024
	C	.036	-	-
MPI	A	-	-	.048
	B	-	-	.071
	C	-	.053	-
	D	.893	.912	.810
	E	.107	.026	.071
P (sem crit.)		27.8	22.8	27.8
H_o		.020	.054	.050
H_e		.027	.052	.065

Apenas o locus MPI apresentou desvio significativo das proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, para as populações de *F. paulensis* ($P = 0,004$) e *F. subtilis* ($P < 0,001$). Para todos os demais loci e populações $P > 0,05$.

O resultado do teste de qui-quadrado por tabelas de contingência demonstra que as diferenças observadas nas frequências alélicas, nos loci GPI e PGDH, entre os três grupos são altamente significativas (Tabela 3). A estatística do índice de fixação F aponta na mesma direção, atribuindo a maior parte da variação a diferenças entre os grupos como indicado pelo valor médio $F_{st} = 0,396$ (Tabela 4).

Tabela 3. Resultados do teste de qui-quadrado por tabelas de contingência para diferenças entre as frequências alélicas dos três grupos estudados.

locus	n° de alelos	qui-quadrado	g.l.	P
PGM	4	8,443	6	0,20740
PGDH	5	139,734	8	0,00000
GPI	2	33,420	2	0,00000
IDHP	2	2,884	2	0,23647
MDH-2	3	4,451	4	0,34834
MPI	5	13,520	8	0,09517
totais		202,453	30	

Tabela 4. Sumário da estatística do índice de fixação (F) em todos os loci.

locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}
PGM	-0,083	-0,048	0,033
PGDH	-0,343	0,552	0,667
GPI	0,205	0,468	0,331
IDHP	-0,037	-0,012	0,024
MDH-2	-0,032	-0,015	0,016
MPI	0,304	0,321	0,024
média	0,037	0,418	0,396

Finalmente os valores dos índices de identidade e distância genética (Tabela 5) sugerem que há maior proximidade filogenética entre o morfotipo II e *F. paulensis* do que entre o morfotipo II e *F. subtilis*, como ilustrado no dendograma de similaridade (Figura 1). O coeficiente de correlação cofenética associado ao dendograma foi de 0,948, indicando que houve pouca distorção dos dados da matriz de similaridade para sua construção.

Tabela 5. Matriz de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética (Nei, 1978)

	<i>F. paulensis</i>	morfotipo II	<i>F. subtilis</i>
<i>F. paulensis</i>	-	0,985	0,928
morfotipo II	0,015	-	0,947
<i>F. subtilis</i>	0,075	0,055	-

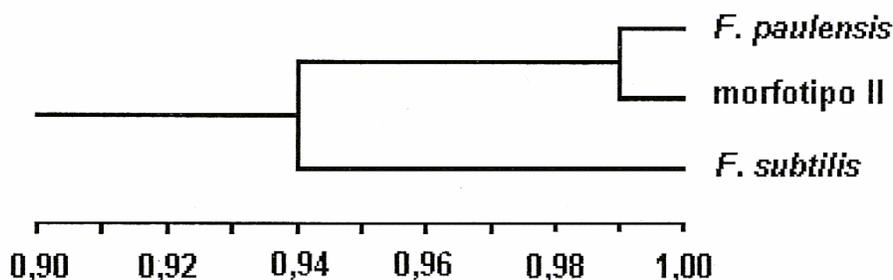


Figura 1. Dendrograma construído a partir do índice de identidade genética de Nei (1978); $r = 0,948$

DISCUSSÃO

A provável existência de tipos morfológicos distintos dentro da espécie *F. subtilis*, já havia sido registrada anteriormente (Burkenroad, 1939; Pérez Farfante, 1967) e uma diferença bem definida foi identificada através da utilização de eletroenfoque (Maggioni, 1996). Esta diferença foi testada no presente estudo através da eletroforese de isoenzimas, mostrando-se significativa.

Os valores de frequência alélica (Tabela 2) já são forte evidência da diferenciação genética entre o morfotipo II e *F. subtilis*. O locus PGDH fornece uma identificação inequívoca, uma vez que as duas amostras não compartilham alelos. Este fato define o locus PGDH como diagnóstico e indica muito claramente a existência de isolamento reprodutivo, principalmente se considerarmos que os exemplares que constituem a amostra provém do mesmo local, ou seja, o morfotipo II e *F. subtilis* são simpátricos. Mais evidência de diferenciação é fornecida pelo locus GPI, onde o alelo A é mais comum para o morfotipo II, enquanto que o alelo B é o mais comum para *F. subtilis*. A análise das variações através do teste de qui-quadrado de contingência (Tabela 3) comprova que as diferenças entre as frequências alélicas observadas nos loci PGDH e GPI são altamente significativas. Os loci PGM e MPI mostram variações mais sutis e não produziram um valor de qui-quadrado significativo ($0,05 < P < 0,25$).

O locus MPI chama a atenção por apresentar desvio das proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras de *F. paulensis* e *F. subtilis*. Considerando um $\alpha = 0,05$, deveríamos esperar para a presente situação no máximo uma rejeição de H_0 para o conjunto total de testes de qui-quadrado. O que se observa, no entanto, para a amostra de *F. subtilis* é que o desvio pode ser atribuído inteiramente à presença de um homozigoto AA. Uma vez que esta é a única ocorrência do alelo A, a simples exclusão deste indivíduo do processamento produz $P = 0,386$, eliminando o desvio. Porém a ocorrência de um homozigoto de alelo raro numa amostra tão pequena sugere a possibilidade da existência de informações adicionais relevantes e, portanto, a necessidade de um estudo populacional mais abrangente. A estatística do índice de fixação F , considera, em termos de processamento estatístico, os três grupos como subpopulações separadas e analisa o grau de endocruzamento de cada subpopulação e da população total. A partir desses valores se pode ter idéia do grau de semelhança entre elas. Valores de F_{is} e F_{it} próximos a zero indicam alto endocruzamento, e portanto homogeneidade populacional; valores negativos indicam excesso de heterozigotos e baixo endocruzamento; valores positivos indicam deficiência de heterozigotos e,

consequentemente, são evidência de estruturação populacional. O valor de F_{st} nunca é negativo e pode ser entendido como o nível de diferenciação genética entre as subpopulações analisadas; quanto maior o valor, maior a diferenciação. Como pode ser observado na Tabela 4, quando considerados desta maneira os três grupos apresentam um alto grau de diferenciação genética, como indicado pelo F_{st} médio de 0,396. O baixo valor médio de F_{is} (0,037), por sua vez, indica que cada grupo pode ser uma subpopulação enquanto que o de F_{it} (0,418) demonstra ser improvável que os três grupos formem uma única população. Comparando morfotipo II em separado com *F. paulensis* obtemos valores médios de $F_{is} = -0,100$, $F_{it} = 0,082$ e $F_{st} = 0,166$; entre morfotipo II e *F. subtilis* obtemos $F_{is} = -0,009$, $F_{it} = 0,307$ e $F_{st} = 0,313$. Estes valores sugerem que é mais coerente considerar morfotipo II como uma subpopulação de *F. paulensis* do que de *F. subtilis*.

Os resultados obtidos anteriormente com eletroenfoque de proteínas totais evidenciaram uma semelhança entre morfotipo II e *F. paulensis* (Maggioni, 1996), em confirmação a suspeitas baseadas em observações morfológicas (D'Incao, com. pess.). Em relação aos resultados do presente estudo, a comparação de morfotipo II separadamente com *F. subtilis* e com *F. paulensis* indica uma maior semelhança daquele com este último, como comprovam os índices de similaridade e distância genética (Tabela 5, Figura 1), apesar de que em todos os casos os valores desses índices indiquem uma proximidade maior que o comumente registrado para espécies diferentes. O locus PGDH não é diagnóstico entre morfotipo II e *F. paulensis* e o locus GPI não apresenta frequências significativamente diferentes ($0,05 < P < 0,10$). Embora a rigor, estas semelhanças não possam ser consideradas como prova de igualdade, elas levantam a possibilidade de que o morfotipo II seja na realidade uma população equatorial de *F. paulensis*.

A presença da espécie *F. paulensis* no litoral nordeste não é um fato inédito. 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 *F. paulensis*. Pérez Farfante (1967), ao descrever a espécie *F. 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 a conclusão de que se tratavam de duas populações de *F. subtilis*.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que morfotipo II se constitui num grupo diferente da espécie *F. subtilis*. A comparação com *F. paulensis* evidencia semelhanças genéticas que sugerem possa se tratar de uma população equatorial desta espécie. Este resultado é de relevante importância pois ambas espécies em questão, além de intensamente pescadas na costa brasileira, são objeto de cultivo e, nesse campo, as informações aqui apresentadas têm importantes conseqüências.

AGRADECIMENTOS

Os autores querem agradecer a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio ao presente trabalho através do Proc.93/2986.1.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, P. B., G. A. WINANS, D. J. TEEL, G. B. MILNER & F. M. UTTER. 1987. Manual for starch gel electrophoresis: a method for the detection of genetic variation. Tech.Rep.NOAA, NMFS 61: 1-19.
- BRAY, W.A, A. L. LAWRENCE, L.J. LESTER, L. L. SMITH. 1990. Hybridization of *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1967) and *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 (Decapoda). J.Crust.Biol., 10(2): 278-283.
- BREWER, G. J. 1970. An introduction of isozymes techniques. Academic Press, New York. 186p.
- BURKENROAD, M. D. 1939. Further observations on Penaeidae of the northern Gulf of Mexico. Bull.Bingham oceanogr.Coll., 6(6):1-62.
- BURUKOVSKI, R. N. 1997. Selection of a type species for *Farfantepenaeus* Burukowski, 1972 (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Proc. biol.Soc. Wash., 110(1):154.
- DALL, W.; B. J. HILL; P.C. ROTH LISBERG, D. J. STAPLES. 1990. The biology of the Penaeidae. Advances in Marine Biology 27. Academic Press, London. 489p.
- DELEVEDOVE, G. C. D. 1996. Genética populacional do camarão-rosa *Penaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul e no litoral de Santa Catarina. Dissertação de mestrado, Fundação Universidade do Rio Grande, 123p.
- D'INCAO, F. 1984. Estudo sobre o crescimento de *Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis* Pérez Farfante, 1967 da Lagoa dos Patos, RS, Brasil (Decapoda, Penaeidae). Atlântica, 7:73-84.
- D'INCAO, F. 1990. Mortalidade de *Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis* Pérez Farfante, 1967 no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil (Crustacea, Penaeidae). Atlântica, 12(2):31-51.
- D'INCAO, F. 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. Atlântica, 13(1):159-169.
- D'INCAO, F. 1995. Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos Dendrobranchiata (Crustacea:Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental. Tese de doutoramento, Universidade Federal do Paraná, 365p.
- FERGUSON, A. B. 1980. Biochemical Systematics and Evolution. Blackie and Son, Glasgow and London, 194pp.
- GUIÑEZ, R. & R. GALLEGUILLOS. 1986. Variaciones de la heterocigocidad en el locus enzimático anhidrasa carbonica entre classes de tamanho en poblaciones de la ostra chilena *Tiostrea chilensis* (Phillippi, 1845). Boln Soc.Biol.Concepción, 57:63-68.
- ISAAC, V.J., J. D. NETO & F.G. DAMASCENO. 1992. Camarão-rosa da costa norte: biologia, dinâmica e administração pesqueira. Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca 1, IBAMA, 187p.
- LESTER, L. J. 1979. Population genetics of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. J. Hered., 70:175-180.
- LESTER, L.J. & 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; 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.Ass. Anal. Chem., 63(1): 69-73.
- MAGGIONI, D. E. 1996. Caracterização de algumas espécies do gênero *Penaeus* do litoral brasileiro através de eletroenfoque. Nauplius, 4:129-137.

- MARVIN, K.T. & C.W. CAILLOUET. 1976. Phosphoglucomutase polymorphism in white shrimp, *Penaeus setiferus*. *Comp.Biochem.Physiol.*, 53B:127-131.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 512p.
- NUMACHI, K. 1981. Sample method for preservation and scanning of starch gel. *Biochem. Genet.*, 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. Western Atlantic Shrimp of Genus *Penaeus*. *Fishery Bull.Fish.Wildl.Serv.U.S.*, 67(3):461-591.
- PÉREZ FARFANTE, I. & B. KENSLEY. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnosis for the families and genera. *Mém.Mus.natn.Hist.nat.Paris*, 175:1-233.
- PROCTOR, R.R.; K.T. MARVIN; L.M. LANSFORD, R.C. BENTON. 1974. Phosphoglucomutase in brown shrimp, *Penaeus astecus*. *J. Fish.Res.Bd Can.*, 31(8):1405-1047.
- REDFIELD, J. A. & J. P.SALINE. Techniques on starch-gel electrophoresis of penaeid prawn enzymes (*Penaeus* spp. and *Metapenaeus* sp.). *Rep.Div.Fish.Oceanogr.CSIRO*, 116:1-19.
- ROCHA, I. P.; E.A. ARRAIS FILHO; C.M.C. FREITAS; M.M.R MARTINS. 1989. Considerações sobre a carcinicultura brasileira. III Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão, João Pessoa, Paraíba,. *Anais*, 1:287-313.
- SHAKLEE, J. B. & C. P. KEENAN. 1986. A practical laboratory guide to the techniques and methodology of electrophoresis and its application to fish fillet identification. *Rep.mar.lab.CSIRO*, 177:159
- SHAKLEE, J. B; F. W. ALLENDORF; D. C. MORIZOT, G. S. WHITT. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans.Am.Fish.Soc.*, 119:2-15.
- SHAW, C. R. & R. PRASAD. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem. Genetic*, 4:297-320.
- SICILIANO, M. R. & C. R. SHAW. 1976. Separation and visualization of enzymes on gels. In: Smith, I., *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Heinemann, Londres, v.2, p.185-209.
- SUNDEN, S. L. F. & 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.
- SWOFFORD, D. L. & R. B. SELANDER. 1981. Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.*, 72: 281-283.
- THOMAS, M. M. 1981. Preliminary results of electrophoretic studies on marine prawns. *Indian J.Fish.*, 28(1-2):292-294.
- VALENTINI, H.; F. D'INCAO; L.F. RODRIGUES; J. E. REBELO NETO; E. RAHN. 1991. Análise da pesca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Atlântica*, 13(1):143-157.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F- statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420.