

Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros

Jaqueline Gusmão¹, Antonio M. Solé-Cava^{1,2}

¹ Laboratório de Biodiversidade Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro (Brasil)

² Department of Environmental and Evolutionary Biology, University of Liverpool, Port Erin Marine Laboratory, Isle of Man (United Kingdom)

Resumen

Los camarones son los recursos más importantes en las exportaciones de animales marinos de Brasil. Las especies *Farfantepenaeus brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*, *Farfantepenaeus sp.*, *Litopenaeus schmitti*, *Xiphopenaeus kroyeri* y *Artemesia longinaris* son las especies nativas más importantes, mientras que *L. vannamei* es la más importante en los cultivos. Relatos recientes indican un decrecimiento en la pesca, que puede ser debida a la sobrepesca en la región. Una legislación y una supervisión eficiente de las actividades pesqueras son necesarias, pero la información necesaria para eso, está basada en el conocimiento de la estructura de estoques, la distribución real de las especies, incluso la presencia de especies sibilinas de penaeideos aún es muy insipiente. En este trabajo presentamos marcadores moleculares de PCR-RFLP (padrones de restricción de productos de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa), basados en secuencias del gene mitocondrial de la citocromo oxidasa 1, para la identificación de las siete especies de camarones comercialmente más importantes de Brasil. La técnica fue eficiente para la identificación de todas las especies, no solo de muestras frescas, como también de muestras industrializadas (descascadas y congeladas; y salgadas y secas al sol). Este sistema diagnóstico podrá ser útil para el control de las actividades pesqueras, y para el control del comercio y la exportación de productos industrializados de camarón, que no podrían ser identificados de otras maneras.

Summary

Molecular diagnostic system for identification of Brazilian commercial Penaeid shrimp species based on cytochrome oxidase I PCR-RFLP markers

Shrimp exports occupy the first position among all fisheries resources from Brazil. *Farfantepenaeus brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*, *Farfantepenaeus sp.*, *Litopenaeus schmitti*, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Artemesia longinaris* are the Brazilian commercially most important native species. Shrimp farming is predominantly directed to the exotic species *L. vannamei*. Some reports made on the regional shrimp fisheries pointed to a decrease in shrimp production indicating that there has been over fishing. Efficient legislation and supervision of fisheries activities for the rational exploitation of the resources are necessary, but the information necessary for that, including stock structure, species distribution and even the presence of cryptic penaeid species is still largely unavailable or at a very early stage of development. In this work species-specific PCR-RFLP markers, based on sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene, were developed for the molecular identification of seven Brazilian commercial shrimp species. The technique was efficient in the identification of fresh or industrialized (un-shelled and frozen or salted and sun-dried) tissues for diagnostic purposes. The diagnosis system developed can be used to help management and supervision of shrimp fisheries activities and for the control of trade and exportation of shrimp products.

Introdução

Os camarões penaeídeos são recursos importantes para a pesca e maricultura mundiais (1 e 2). No Brasil, as exportações de camarões ocupam o primeiro lugar na comercialização de pescado (3). Em 1999, as pescarias alcançaram 53 450 toneladas métricas (Tm) e a produção de cultivo correspondeu a 16 950 Tm (5). As espécies comerciais mais importantes são *Farfantepenaeus brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*, *Farfantepenaeus sp.* (6 e 7), *Litopenaeus schmitti*, *Xiphopenaeus kroyeri* e *Artemesia longinaris* (3, 8, 9 e 10). A composição pesqueira varia ao longo da costa brasileira: no Sul e Sudeste a pesca comercial é direcionada para *F. paulensis*, *F. brasiliensis* e *L. schmitti*, enquanto no Norte e Nordeste as capturas são principalmente de *F. subtilis* e *L. schmitti* (3, e11). No Norte do Brasil a pesca é realizada em um dos mais importantes bancos camaroneiros do mundo, estendendo-se de Tutóia, no Maranhão (Brasil), ao delta do Orinoco (Guiana) (12). A espécie exótica *L. vannamei* é a preferencialmente cultivada (13).

Recentemente foi feito um estudo para o esclarecimento do status taxonômico de algumas espécies de penaeídeos, usando análise aloenzimática e de seqüências de DNA mitocondrial (citocromo oxidase I - COI). Neste trabalho, uma nova espécie de *Farfantepenaeus* foi revelada e as distribuições de *F. paulensis*, *F. subtilis* e *Farfantepenaeus* sp. foram esclarecidas (6). A existência da espécie nova foi posteriormente confirmada por estudos de seqüências do gene mitocondrial 16S (7). Estudos visando a caracterização genética de populações naturais também foram realizados (14, 15 e 16) indicando a presença de diferentes estoques ao longo da costa.

No Brasil, a pesca camaroneira é exercida sobre os dois estratos populacionais em que se distribuem as espécies: os juvenis são capturados nos criadouros naturais pela pesca artesanal, enquanto a frota industrial captura adultos no oceano (8). Estudos feitos em diferentes regiões do Brasil mostraram um decréscimo na produção camaroneira do Sul, Sudeste e Norte (3, 8 e 9). Concluiu-se que o recurso estaria sendo sobrepescado em função do crescimento desordenado da frota industrial, do incremento da pesca artesanal nos criadouros e da ineficácia da legislação e fiscalização (11 e 17). Fica evidente a necessidade de uma legislação mais eficiente e supervisão das atividades de pesca para a exploração racional dos recursos. Entretanto, a informação necessária para isto, incluindo estrutura dos estoques, distribuição das espécies e mesmo a presença de espécies crípticas, ainda é escassa ou se encontra em um estágio inicial de desenvolvimento.

Neste trabalho é apresentado um sistema de diagnose, por PCR-RFLP, para a identificação de sete espécies brasileiras de camarões comerciais. Este sistema é baseado em um trabalho prévio de análise por PCR-RFLP de seqüências do gene mitocondrial COI de cinco espécies de penaeídeos (6). O sistema anterior foi simplificado pela utilização de apenas duas enzimas de restrição e suplementado com uma seqüência publicada de *L. vannamei*, uma seqüência nova da espécie nativa *L. schmitti*, e com padrões de restrição enzimática de *X. kroyeri*. O sistema foi eficiente, permitindo a identificação correta de espécimes congelados ou salgados e secos ao sol, de diferentes espécies de camarões penaeídeos de importância comercial.

Material e métodos

Coleta

Indivíduos das espécies nativas *F. brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis*, *Farfantepenaeus* sp. (6 e 7), *L. schmitti* e *X. kroyeri* foram coletados em sete localidades do litoral brasileiro (figura 1). Para cada espécie nativa foram escolhidos ao menos dois pontos de coleta, localizados em áreas opostas de sua distribuição (Norte/Sul). Sete amostras de DNA da espécie de cultivo *L. vannamei* do Nordeste do Brasil também foram incluídas na análise. As amostras coletadas foram transportadas em gelo seco até o laboratório, onde foram identificadas morfológicamente (18), e fragmentos do tecido muscular de cada indivíduo foram preservados em nitrogênio líquido. Espécimes das espécies crípticas *F. subtilis* e *Farfantepenaeus* sp. foram identificados baseados nas características do sulco adrostral (6).

Para testar a eficiência do sistema em tecidos potencialmente degradados, também foi extraído DNA de amostras compradas em mercados e supermercados no Rio de Janeiro. As amostras foram adquiridas em três diferentes formas: frescas e refrigeradas (N = 5), descascadas e congeladas (N = 3) e salgadas e secas ao sol (N = 4). As amostras foram transportadas em gelo até o laboratório (exceto as amostras salgadas e secas ao sol, que

foram transportadas em temperatura ambiente), onde foram preservadas a -20°C por um período de três meses antes da extração de DNA ser conduzida.

Figura 1
Pontos de coleta



Purificação do DNA total

A extração de DNA total foi feita usando um protocolo (CTAB) modificado (19). Uma porção do tecido muscular foi picada em uma placa de Petri com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e transferida para um tubo de microcentrifuga contendo 700 µl de tampão de lise (CTAB 2%, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0.2 % v/v, Tris 100 mM, NaCl 1,4 mM e proteinase K 10 µg/mL, pH 8.0). Após um período de 2 h 30 min de incubação a 60°C, o extrato foi misturado com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), centrifugado, e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 0,7 de volume de isopropanol.

Amplificação da citocromo oxidase I

Uma seção 3' de 677 pb do gene mitocondrial da citocromo oxidase (subunidade I) foi amplificada usando os oligonucleotídeos iniciadores CO1f [5' - CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC - 3'] (20) e CO10 [5' - TAAGCGTCTGGGTAGTCTGA(A/G)TA(T/G)CG - 3'] (21). Para as reações de PCR foram usados 50 ng de DNA molde, 1,5 unidade de Taq polimerase (Pharmacia), 200 µM de cada dinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, em 25 µl de tampão de PCR 1x (Pharmacia). As reações de PCR foram conduzidas em um miniciclador PTC-100 (MJ Research) programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto, e 72°C por 45 segundos, e uma etapa final de 5 minutos de extensão a 72°C. Controles negativos, consistindo de reações sem DNA molde, foram incluídos em todas as amplificações.

Seqüenciamento do fragmento de 677 pb da Citocromo Oxidase I

A purificação dos produtos amplificados foi feita usando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as especificações do fabricante. O seqüenciamento direto de ambas as fitas da molécula de DNA amplificado foi feito utilizando corantes fluorescentes de terminação (Thermo Sequenase™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit), em seqüenciador automático modelo ABI 377 (Perkin Elmer Inc.).

Análise por RFLP do fragmento da COI

As seqüências COI obtidas para *L. schmitti* foram comparadas com àquelas disponíveis na base de dados de seqüências (GenBank®) de *F. brasiliensis*, *F. paulensis*, *F. subtilis* e *Farfantepenaeus* sp. (Números de Acesso AF248549 a AF248560) e de *L. vannamei* (Número de Acesso AF029390). As seqüências COI das seis espécies foram inicialmente analisadas com o programa Webcutter, versão 2.0 (escrito por Max Heiman e disponível na internet na URL <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>), para a procura de sítios de restrição enzimática que produzissem padrões que diferenciasssem as espécies. Duas enzimas (Hinf I e Hinc II) foram selecionadas. O produto de PCR da espécie *X. kroyeri* não foi seqüenciado, mas foi eficientemente usado na análise de digestão com o sistema combinado Hinf I / Hinc II. A digestão com essas duas enzimas produziu sete haplótipos espécie-específicos diferentes (figuras 2 e 3). Com o objetivo de verificar a existência de polimorfismos intra-específicos, 20 indivíduos de cada espécie foram analisados com o sistema Hinf I / Hinc II.

As análises de RFLP dos produtos amplificados seguiram procedimentos padrão (22), usando os produtos não purificados das reações de PCR (10 µl da reação de PCR por 20 µl da reação de restrição). As reações de restrição enzimática foram conduzidas segundo a recomendação dos fabricantes (Hinf I - GibcoBRL®; Hinc II - New England BioLabs), por quatro horas a 37°C, e os produtos de digestão foram separados por três horas através de eletroforese em géis de agarose a 2% ou poliacrilamida a 5%, com tampão TBE (23). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV em um transiluminador, usando o sistema digital Kodak DC 290. Os padrões de bandas foram analisados visualmente, e os padrões esperados para as diferentes espécies foram confirmados para todas as amostras.

Validação do sistema Hinf I / Hinc II de diagnose usando um teste “duplo-cego”

A validação do sistema diagnóstico foi feita pela repetição da identificação de trinta e nove amostras em um procedimento constituído de quatro etapas: (a) amostras de DNA de cinco indivíduos de cada espécie foram escolhidas ao acaso, incluindo amostras coletadas em diferentes localidades, por um dos autores (JG), e entregues a uma segunda pessoa, (b) que substituiu os números originais por números aleatórios gerados por computador (MS-Excel®). As amostras renumeradas foram então embaralhadas e devolvidas para JG, (c) que realizou a amplificação, digestão, eletroforese, coloração e documentação fotográfica dos padrões de digestão enzimática. As fotografias dos padrões de digestão foram então (d) passadas, juntamente com fotografias de amostras-padrão dos haplótipos espécie-específicos, para dez pessoas diferentes do nosso Laboratório, que não haviam participado de nenhuma das etapas do trabalho e não estavam familiarizadas com o sistema diagnóstico até então. Estas pessoas compararam os padrões de digestão obtidos para cada uma das amostras numeradas aleatoriamente com os padrões fornecidos das diferentes espécies, e utilizaram o sistema combinado de digestões Hinf I / Hinc II para identificar individualmente as trinta e nove amostras. As planilhas de resultados produzidas pelas dez pessoas foram comparadas, e a porcentagem de erros do sistema calculada

Figura 2

Seqüências de COI e sítios de restrição de Hinc II (**GTPy↓PuAC**) e Hinf I (**G↓ANTC**). Regiões de pareamento do oligonucleotídeo iniciador no gene COI humano estão indicadas em azul

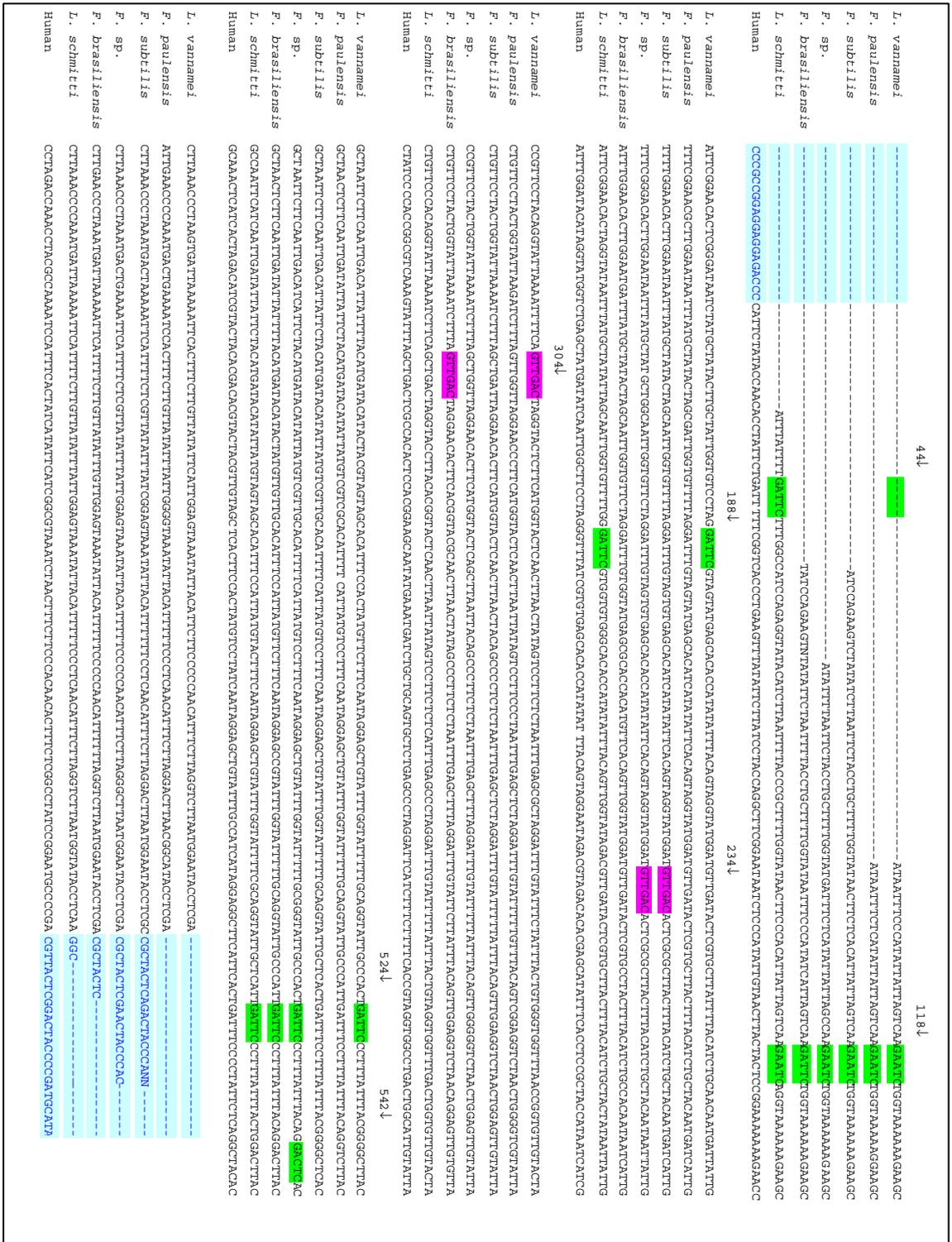
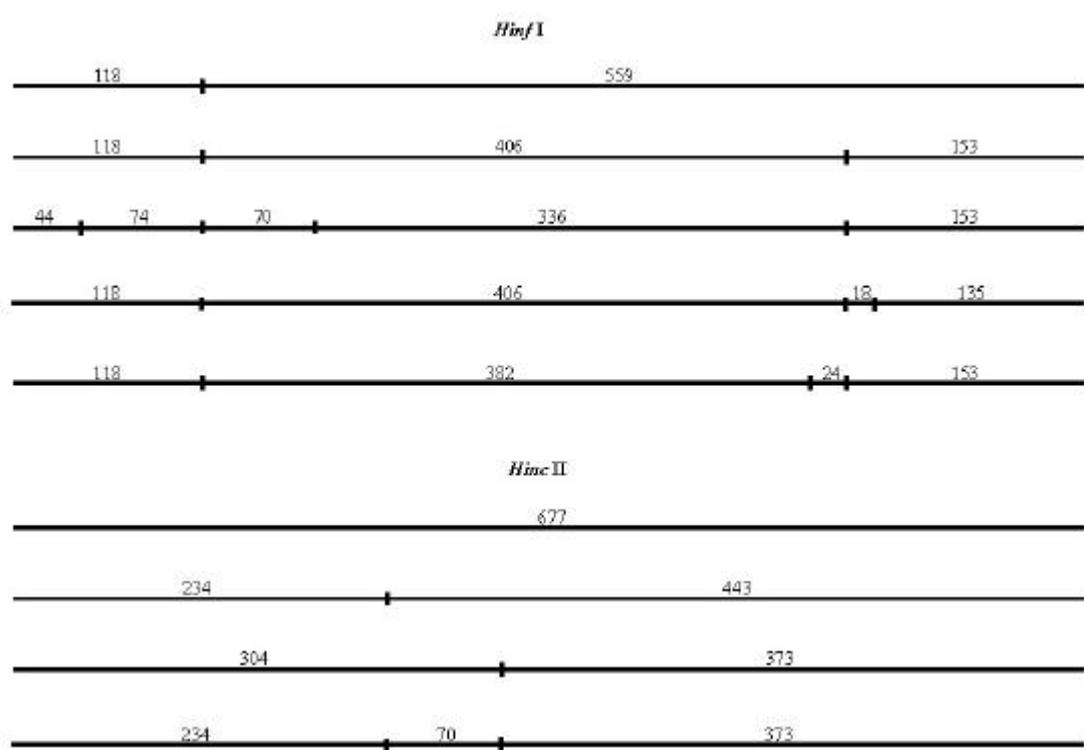


Figura 3
Mapas de restrição de Hinf I e Hinc II



Hinf I- A: *Farfantepenaeus paulensis*, *F. subtilis* e *Xiphopenaeus kroyeri*; B: *F. brasiliensis*; C: *Litopenaeus schmitti* e *L. vannamei*; D: *Farfantepenaeus* sp.; E: *X. kroyeri*.

Hinc II- A: *F. paulensis* e *L. schmitti*; B: *Farfantepenaeus* sp. e *F. subtilis*; C: *F. brasiliensis*, *L. vannamei* e *X. kroyeri*; D: *X. kroyeri*

Análise por PCR-RFLP de amostras de mercado

As análises por PCR-RFLP de amostras comerciais foram realizadas sem o conhecimento prévio das identidades taxonômicas das mesmas. A identificação morfológica de amostras frescas e salgadas foi feita após o diagnóstico molecular. Amostras industrializadas/congeladas não foram analisadas morfológicamente uma vez que consistiam apenas de abdômes sem carapaça.

Resultados

As seqüências parciais do gene COI obtidas para *L. schmitti* e os mapas de restrição das enzimas Hinf I e Hinc II, obtidos para todas as espécies analisadas, são mostrados nas figuras 2 e 3. A seqüência da porção 3' do gene COI obtida para *L. schmitti* foi depositada no banco de dados de seqüências (GenBank®) sob o Número de Acesso AF542058. Os padrões esperados de restrição enzimática (figuras 2 e 3) foram confirmados por análise de PCR-RFLP de 116 indivíduos (tabela I). Todos os padrões Hinf I / Hinc II esperados foram consistentemente reproduzidos para espécimes analisados pertencentes a alguma das espécies seqüenciadas. *Xiphopenaeus kroyeri*, para o qual as seqüências do gene COI ainda não estão disponíveis, revelou dois haplótipos distintos entre os indivíduos testados. Cada

um destes dois haplótipos foi caracteristicamente observado em amostras ou do nordeste ou do sudeste do Brasil, indicando provavelmente, a presença de dois estoques geneticamente diferentes para esta espécie (figura 4).

Tabela I

Padrões de restrição por PCR-RFLP de Hinc II / Hinf I das espécies estudadas

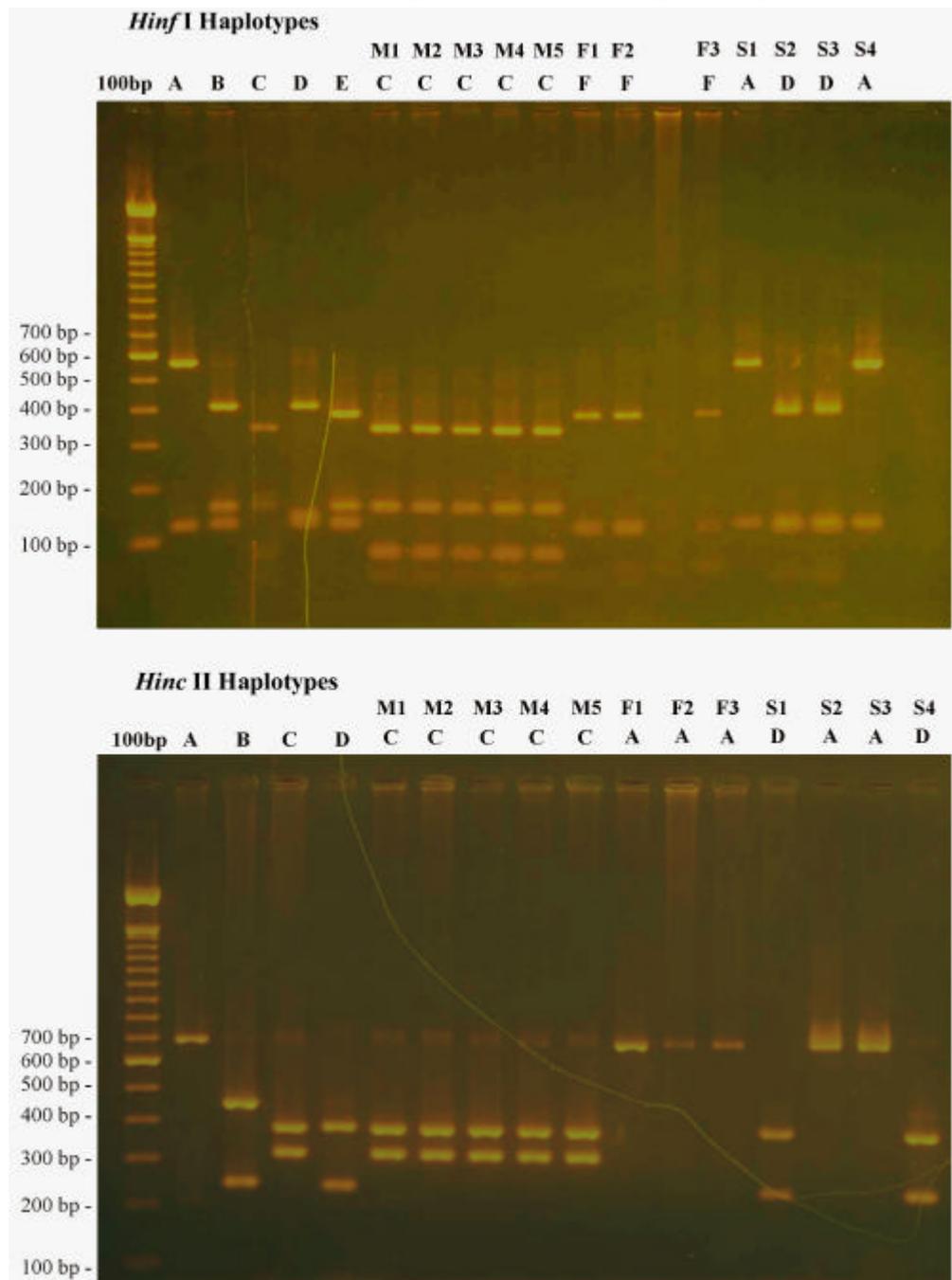
Espécies	Nº. de amostras	Localidade	Hinf I / Hinc II haplótipos
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	10	Fortaleza	BC
	10	Itajaí	BC
<i>F. paulensis</i>	9	Rio	AA
	10	L. Patos	AA
<i>Farfantepenaeus</i> sp.	10	Fortaleza	DB
	10	Ilhéus	DB
<i>F. subtilis</i>	11	Atins	AB
	9	Fortaleza	AB
<i>Litopenaeus schmitti</i>	10	Atins	CA
	1	Fortaleza	CA
	7	Rio	CA
	3	Itajaí	CA
<i>L. vannamei</i>	7	Panama	CC
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	10	Natal	EC
	5	Rio	AD
	5	Espírito Santo	AD

A validação do sistema desenvolvido, usando um teste “duplo-cego” com 39 espécimes anônimos, mostrou uma taxa de acerto de 99,2 % na identificação dos haplótipos (6 erros em 780 identificações de haplótipos) e de 98,5 % na identificação correta das espécies (usando o sistema combinado Hinf I / Hinc II) quando dez pessoas, não familiarizadas com o procedimento, analisaram os padrões de restrição. Os seis erros de identificação ocorreram na caracterização dos haplótipos D e E da enzima Hinf I, correspondendo às espécies *F. brasiliensis* e *X. kroyeri* respectivamente. A diferença entre estes dois haplótipos da enzima Hinf I é de fato sutil (uma diferença de 24 pares de bases - pb - no fragmento maior, que tem 406 pb em *F. brasiliensis* e 382 pb em *X. kroyeri*; figuras 3 e 4), de maneira que recomendamos a inclusão de padrões de digestão Hinf I de ambas espécies, em posições centrais do gel, para facilitar a identificação dos haplótipos, ou a utilização de uma agarose com maior poder de resolução.

A purificação de DNA, amplificação por PCR e análise por PCR-RFLP de amostras de mercado (5 frescas e 4 salgadas/secas ao sol) e industrializadas (3 congeladas) também foram realizadas com sucesso usando o sistema combinado Hinf I / Hinc II de diagnóstico. A identificação molecular das amostras frescas de mercado foi confirmada a posteriori por identificação morfológica, correspondendo à espécie *L. vannamei* (apesar de não haver indicação, no mercado, de que se tratava de camarão cultivado). Similarmente, duas das amostras salgadas/secas ao sol foram corretamente identificadas, através do sistema Hinf I / Hinc II, como *X. kroyeri*. Entretanto, as outras duas amostras salgadas apresentaram um haplótipo Hinf I / Hinc II diferente dos sete usados como padrões. A análise morfológica mostrou que estas amostras pertenciam à espécie *Pleoticus muelleri* (Família Solenoceridae). Da mesma forma, as três amostras industrializadas/congeladas apresentaram um nono haplótipo, indicando que as mesmas não pertencem a nenhuma das outras oito espécies.

Infelizmente, a identificação morfológica destas amostras não foi possível, uma vez que os camarões industrializados são normalmente embalados sem as respectivas carapaças.

Figura 4
Padrões espécie-específicos de digestão enzimática em géis de agarose 2%



- (A) **Hinf I**: padrão de peso molecular de 100 pb; A-E: Haplótipos; M1-M5: amostras frescas de mercado; F1-F3: amostras industrializadas congeladas; S1-S4: amostras de mercado salgadas/secas ao sol.
- (B) **Hinc II**: padrão de peso molecular de 100 pb; A-D: Haplótipos; M1-M5: amostras frescas de mercado; F1-F3: amostras industrializadas congeladas; S1-S4: amostras de mercado salgadas/secas ao sol

Discussão

Neste trabalho, um sistema diagnóstico usando PCR-RFLP foi desenvolvido para a identificação molecular de espécimes de sete espécies brasileiras de camarões comerciais, a partir de tecidos frescos, salgados/secos ao sol, ou industrializados (congelados). A análise genética tem sido largamente utilizada em estudos de conservação e auxílio do manejo da pesca de uma variedade de espécies (24). Os recursos de pesca marinhos, diferentemente de vegetais ou animais domesticados, ainda são consumidos, com raras exceções, diretamente de populações naturais, o que representa um risco contínuo de diminuição dos estoques ou mesmo de extinção de espécies comercialmente exploradas (25, 26 e 27). A identificação correta de espécies diferentes é fundamental para o manejo e supervisão das atividades de pesca, assim como para o controle da comercialização e exportação de produtos frescos e industrializados. O sistema de diagnose de espécies desenvolvido neste trabalho pode ser extremamente útil na identificação forense de comércio ilegal durante os períodos de defeso, assim como para a caracterização de produtos industrializados (congelados), para os quais a identificação das espécies envolvidas seria de outra maneira impossível.

Conclusões

Neste trabalho, marcadores espécie-específicos produzidos por PCR-RFLP foram desenvolvidos para a identificação molecular de sete espécies comerciais brasileiras de camarões penaeídeos, com 98.5 % de segurança no diagnóstico, usando tecido fresco ou industrializado para a análise. O sistema diagnóstico produzido pode ser usado como ferramenta auxiliar no manejo e supervisão das atividades de pesca, assim como para o controle da comercialização e exportação de camarões.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Pedro M. Galetti Jr., por nos ter fornecido DNA purificado de amostras de *L. vannamei*, a Cristiano Lazoski, por sugestões ao manuscrito e ajuda no procedimento de validação do sistema usando o teste duplo-cego, e a Camila Sibata, Carla Zilberberg, Daíza Lima, Daniela Cabral, Haydée Cunha, Helio Buchmuller, Renata Schama, Renilson Batista e Taíssa Machado pela identificação dos haplótipos nos testes de validação do sistema. Este trabalho foi financiado por projetos do CNPq, PADCT e FAPERJ (Brasil).

Referências

1. HOLTHUIS LB. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO species catalogue. *FAO Fish. Synop.*, Roma. 1980;125:I-XVII:1-271
2. SUNDEN SLF, DAVIS SK. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture* 1991; 97:131-42
3. NETO JD. Pesca de camarões na costa norte do Brasil. *Atlântica* 1991;13:21-8
4. FAO. *FAOSTAT Statistics Database 2001* (acessada em 20 de agosto de 2002). URL: <http://apps.fao.org>

5. FAO. *Fishstat Plus 2.30*: Universal software for fishery statistical time series. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit, 2000
6. GUSMÃO J, LAZOSKI C, SOLÉ-CAVA AM. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Mar Biol* 2000;137:435-46
7. MAGGIONI R, ROGERS AD, MACLEAN N, D'INCAO F. Molecular phylogeny of western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2001;18:66-73
8. VALENTINI H, CASTRO P, SERVO GJM, CASTRO L. Evolution of the demersal fishery in the south eastern Brazilian coast by the bottom pair trawlers based in São Paulo, between 1968 and 1987. *Atlântica* 1991;13:87-95
9. NETO JD, DORNELLES LDC. *Diagnóstico da pesca marítima do Brasil. Coleção Meio Ambiente* (Série Estudos - Pesca, 20), IBAMA, Brasília, 1996.
10. MELQUIADES PP. *Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil*. UFCE, UFC Edições, 1997
11. VALENTINI H, D'INCAO F, RODRIGUES LF, NETO JER, RAHN E. Análise da pesca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) nas regiões sudeste e sul do Brasil. *Atlântica* 1991;13:143-57
12. ISAAC VJ, NETO JD, DAMASCENO FG. *Camarão-rosa da costa norte. Coleção Meio Ambiente* (Série Estudos - Pesca, 1), IBAMA, Brasília, 1997
13. ALVAREZ R, ALTUVE D, ALIO J, MARCANO L, COCHRANE K, TANDSTAD M. *Assessment of roncador (Micropogonias furnieri) within the Orinoco and Gulf of Paria region*. FAO, Rome (Italy), 1999
14. DELEVADOVE GCD. *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*. Depto. de Oceanografia. FURG, Rio Grande, 1996
15. GUSMÃO J, LAZOSKI C, SOLÉ-CAVA AM. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* spp. and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). *I Congresso Brasileiro de Oceanografia*, Rio de Janeiro, 2002
16. VOLOCH CM, SOLÉ-CAVA AM. Genetic structure of the sea-bob shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri* Heller, 1862; Decapoda: Penaeidae) along the Brazilian southeastern coast. *I Congresso Brasileiro de Oceanografia*, Rio de Janeiro, 2002
17. D'INCAO F. Pesca e Biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. *Atlântica* 1991;13:159-69
18. PEREZ-FARFANTE I, KENSLEY B. *Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera*. Éditions du Muséum Paris 1997;175:1-79
19. DAMATO ME, CORACH D. Genetic diversity of populations of the fresh-water shrimp *Macrobrachium borellii* (Caridea, Palaemonidae) evaluated by rapd analysis. *J Crust Biol* 1996;16:650-5
20. PALUMBI SR, BENZIE J. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1991;1:27-34
21. BALDWIN JD, BASS AL, BOWEN BW, CLARK WH. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol Phylogenet Evol* 1998; 10:399-407.
22. CHOW S, CLARKE ME, WALSH P J. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): A simple method for species and stock identification. *Fish Bull* 1993;91:619-27
23. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning - a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989
24. AVISE JC, HAMRICK JL. *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall, New York, 1996.

25. SOLÉ-CAVA AM. Genética da Conservação. En: MATTIOLI S, ed. *Genética Molecular e Evolutiva*. Holos Press, São Paulo, 2001
26. THORPE JP, SOLÉ-CAVA AM, WATTS PC. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. En: SOLÉ-CAVA AM, RUSSO CAM, THORPE JP, eds. *Marine Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000:165-84
27. WARD RD. Genetics in fisheries management. En: SOLÉ-CAVA AM, RUSSO CAM, THORPE JP, eds. *Marine Genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000:191-201