

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

LUISA SIMBINE

Análise da diversidade e estrutura genética de *Fenneropenaeus indicus* e *Metapenaeus monoceros* com base no mtDNA e uso do DNA barcoding na identificação das espécies de Peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) da costa de Moçambique

SÃO CARLOS – SP  
2015

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

Análise da diversidade e estrutura genética de *Fenneropenaeus indicus* e *Metapenaeus monoceros* com base no mtDNA e uso do DNA barcoding na identificação das espécies de Peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) da costa de Moçambique

**Luisa Simbine**

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

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior**

SÃO CARLOS – SP  
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S588a Simbine, Luisa  
Análise da diversidade e estrutura genética de Fenneropenaeus indicus e Metapenaeus monoceros com base no mtDNA e uso do DNA barcoding na identificação das espécies de Peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) da costa de Moçambique / Luisa Simbine. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Variabilidade genética. 2. Identificação. 3. Peneídeos. 4. mtDNA. 5. COI. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Luisa Simbine, realizada em 23/06/2015:

---

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
UFSCar

---

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama  
UFSCar

---

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
UFSCar

---

Prof. Dr. Cláudio Oliveira  
UNESP

---

Profa. Dra. Jaqueline Gusmão  
UFRJ

## ***Dedico***

Ao meu filho, **Rui Miguel Mussá,**

Um filho sempre presente em todos os momentos da minha vida que, com muito carinho e muita dedicação, sempre me deu forças para nunca desistir dos meus ideais. Em vários momentos, mostrou-me que valia a pena continuar mesmo quando a saúde me faltou, ele sempre dizia: “**Mãe, tenho muito orgulho de te ter como mãe, tu és um exemplo a seguir**”.

Ao meu netinho, **Ricardo Miguel Lopes Mussá.**

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

**(Martin Luther King)**

## AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a Deus por ter me guiado o tempo todo para que conseguisse chegar onde estou.

Ao Professor Dr Pedro Manoel Galetti Junior, pela orientação, por ter me aceitado nesta instituição e por todo apoio prestado ao longo do curso.

Ao Rui Miguel Mussá, meu filho, porque sempre soube estar presente em todos os momentos difíceis passados ao longo destes quatro anos.

À Carla Guinart Marques, minha colega, pela paciência tida comigo e por todo apoio desde a chegada a São Carlos.

À Dra Patricia que sempre teve conselhos e idéias para melhorar o trabalho.

Ao Dr Jorge Ramirez, meu colega, que nunca me deixou mal, teve muita paciência comigo e a todo o momento que precisei esteve sempre pronto a ajudar sem nunca reclamar.

Ao Dr Baptista Bina, amigo de Moçambique Baptista foi mais que um irmão. Nunca teria conseguido concluir o curso se o Baptista não me tivesse amparado quando mais precisei. Baptista foi quem procurou as clínicas, médicos e de mãos dadas, com toda paciência, me acompanhou aos tratamentos de fisioterapia ao longo dos três meses para que eu recuperasse o equilíbrio. Até hoje, Bina pergunta: “como te sentes hoje”, como se receasse que uma recidiva acontecesse. Obrigada Bina, não só pelo amigo que és, mas por todo apoio nas atividades acadêmicas.

À minha eterna amiga Marcia, pela amizade, pelo apoio em todos os momentos que precisei mesmo distante.

À amiga Gislaine de Paula, irmã que ganhei no Brasil, jamais me esquecerei da força das suas palavras, quando pensei que não conseguiria mais caminhar, nunca deixou de me encorajar a prosseguir nesta árdua tarefa, mesmo estando distante de mim.

Ao Dr Domingos Zefanias Gove, meu Diretor de serviço que acreditou em mim e tornou possível a vinda ao Brasil.

À Dra Paula Santana Afonso, Diretora do Instituto de Investigação Pesqueira de Moçambique que, além do apoio na aquisição das amostras, tornou possível minha viagem para Índia na busca de respostas para a pesquisa.

Ao Dr Atanasio Brito, que além de Diretor científico, sempre soube dar seu apoio como colega e amigo.

A todos os colegas brasileiros: Uesley, Bruno, Eliana, Michelle, Fernando Peron, Dra Danielly e a todos os demais colegas que, direta ou indiretamente, tornaram possível este trabalho.



## RESUMO

Os camarões peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) constituem um recurso pesqueiro de grande importância econômica mundial tanto para a indústria pesqueira quanto para a aquicultura. Em Moçambique, a indústria pesqueira constitui uma das bases da sua economia, onde a pesca do camarão chega a render cerca de 80 milhões de dólares anuais. Nos últimos anos, tem-se verificado uma redução na pesca do camarão, provavelmente devido à sobrexplotação e à presença de espécies exóticas. Este é o primeiro estudo genético envolvendo as espécies de maior valor econômico de Moçambique. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional das espécies *Fenneropenaeus indicus* e *Metapenaeus monoceros* e identificar através do DNA barcoding nove espécies de camarão peneídeo. Para avaliar a diversidade e a estrutura genética de *F. indicus* e *M. monoceros*, foram coletadas 160 amostras ao longo da costa de Moçambique e analisados os genes mitocondriais COI (citocromo oxidase subunidade 1), Cyt b (citocromo oxidase subunidade b) e a região controle D-loop. Foi observada uma alta diversidade genética, sendo que o D-loop apresentou os valores mais elevados (*F. indicus*: Hd=1; h=13; Hi=0,0133; *M. monoceros*: Hd=0,99; h=24; e Hi=0,0092). O D-loop apresentou haplótipos únicos. Os valores do teste D de Tajima e Fs de Fu foram negativos e significativos para os genes COI e Cyt b. As curvas de distribuição *mismatch* sugeriram que as duas espécies passaram por uma expansão populacional recente de 10,397 e 28,418 anos para *F. indicus* e *M. monoceros*, respectivamente. A AMOVA referente aos genes COI e Cyt b mostrou que mais de 99% da variação ocorre dentro das populações. Os valores de  $F_{ST}$  par a par indicaram não haver estruturação populacional. A natureza das correntes marinhas ao longo do canal de Moçambique, bem como a ausência completa de barreiras físicas e/ou ambientais podem ser os principais fatores que influenciam a manutenção destas duas espécies como populações únicas. Para a identificação dos peneídeos de Moçambique com base no DNA barcoding, um total de 69 amostras foi coletado na Baía de Maputo. A árvore de distância genética agrupou seis espécies em dois clados com relação ao lugar de origem, sugerindo a presença de duas linhagens. A distância genética intraespecífica variou de 0 a 8,636 e a distância interespecífica variou de 3,897 a 21,558. A análise da distribuição de distância para o vizinho mais próximo variou de 3,897 a 18,971. A ferramenta de identificação DNA barcoding, foi eficiente na identificação das espécies de peneídeos da costa moçambicana.

**Palavras chaves:** Variabilidade Genética, Identificação, Peneídeos, mtDNA, , COI, Cyt b, Dloop

## ABSTRACT

The penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) are the most economically fishing resource of the greatest global importance both for fisheries and the aquaculture industry. Shrimp fishing is one of the pillars of national economy in Mozambique, where they provide around USD 80,000,000 per year in export earnings. In recent years there has been observing a reduction in the shrimp fishery industry probably due the over-exploitation or due the presence of other shrimp species that were not been observed on the coast Mozambique before which may competing for the ecological niche. Despite the great fishing economic importance of penaeid shrimps in Mozambique, there is no genetic scientific literature available thus far on their genetic characteristics. Therefore, this is the first work addressing the genetic diversity of penaeids species of greatest economic value from Mozambique coast *F. indicus* and *M. monoceros*, for the first time shrimp from this coast were identified using DNA Barcoding tool. In addition, for the first time sequences of penaeid shrimp from Mozambique coast were deposited in GenBank and Bold system. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity and population structure of the species *F. indicus* and *M. monoceros*, and identify nine species of penaeids from the Mozambican coast. To assess the genetic diversity and structure of *F. indicus* and *M. monoceros*, 160 samples were collected along the Mozambique coast. Three mitochondrial genes (COI, Cyt b, and the control region D-loop) were analyzed. A great genetic diversity was observed, however, the D-loop presented higher values (*F. indicus*: Hd = 1, h = 13; Hi = 0.0133, *M. monoceros* Hd = 0,99; H-24; and Hi = 0.0092). D-loop showed unique haplotypes; the Tajima D test and Fu Fs values were negative and significant for the COI and Cyt b genes. The mismatch distribution curves suggested that the two esp ceis undergone to a recent population expansion (10.397 to 28.418) years ago *F. indicus* and *M. monoceros* respectively. The AMOVA analysis showed that over 99% of the variation occurs within populations. The Fst Pairwise values pointed to a non structured population. The nature of ocean currents along the Mozambique channel as well as the complete absence of physical and / or environmental barriers may be the main factors that influence the non structure of these two species. To identify shrimp penaeids from Mozambique based on DNA barcondig, a total of 69 samples were collected in the Maputo Bay. The genetic distance tree grouped six species into two clades as to the place of origin, suggesting the presence of cryptic species. The intraspecific genetic distance ranged from (0 to 8.636) and interspecific distance from (3.897 to 21.558). The distance distribution analysis

of the nearest neighbor ranged from (3.897-18.971). The DNA Barcoding identification tool was efficient to identify the Penaeid species from mozambican coast. However the presence of cryptic species pointed the need for further studies which must be conducted using molecular analyzes; morphological taxonomy and the ecological treats to evaluate each of the sibling species to reach a correct decision of the taxonomic status.

**Keywords:** Genetic variability, Identification, Penaeids, mtDNA, COI, Cyt b, Dloop

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida dos camarões pertencentes à família Penaeidae .....	21
Figura 2 - Mapa de Moçambique indicando os pontos de coleta para as duas espécies analisadas.....	32
Figura 3 - Gráfico da curva de distribuição das diferenças ( <i>mismatch distribution</i> ) para espécie <i>F. indicus</i> e gene COI, indicando os valores da soma dos desvios dos quadrados e o respectivo valor de p. ....	36
Figura 4 - Gráfico da curva de distribuição das diferenças ( <i>mismatch distribution</i> ) para espécie <i>M. monoceros</i> e gene COI, indicando os valores da soma dos desvios dos quadrados e o respectivo valor de p.....	36
Figura 5 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do COI na espécie <i>F. indicus</i> . . .....	38
Figura 6 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do Cyt b na espécie <i>F. indicus</i> .	39
Figura 7 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do COI para a espécie <i>M. monoceros</i> . ....	39
Figura 8 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do Cyt b para a espécie <i>M. monoceros</i> .....	40
Figura 9 - Mapa da baía de Maputo e de Moçambique (a) Mapa da baía de Maputo; (b) Mapa de Moçambique. ....	48
Figura 10 – Estruturas morfológicas da genitália masculina e feminina, espinho basal e periópode de <i>M. dobsoni</i> .....	51
Figura 11 - Imagem lateral de <i>Mierspanaeopsis scuptilis</i> (Heller,1862) coletada e fotografada em 2013 na Bahia de Maputo em Moçambique, durante o monitoramento da espécie. ....	52
Figura 12 - Árvore da distância genética mostrando a divisão nos clados pertencentes às espécies: <i>M. japonicus</i> , <i>P. monodon</i> , <i>P. semisulcatus</i> , <i>F. merguensis</i> , <i>F. indicus</i> , e <i>M. dobsoni</i> .....	53
Figura 13 - Gráfico de quadrantes considerando dados nominais considerando um limiar de distância intraespecífica < 2.0%; Distância interespecífica > que 2.0%. ....	56
Figura 14 - Gráfico Barcode gap apresentando a distribuição da frequência vs divergência das sequências (nominal). ....	57
Figura 15 - Gráfico de DNA barcoding mostrando a diferença máxima dentro das espécies no eixo x (0,948) e mínima entre as espécies no eixo y (2,4). ....	59

Figura 16- Gráfico barcode gap mostrando os valores da distância máxima intraespecífica e mínima interespecífica..... 60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisão da classificação taxonômica da família Penaeidae e listagem dos gêneros que ocorrem na região IWP e SWIO e das espécies que habitam as águas da região SWIO.	18
Tabela 2 - Espécies que ocorrem em Moçambique, incluindo as exóticas (*).	19
Tabela 3 - Números de indivíduos, espécies analisadas, local da coleta e coordenadas geográficas dos pontos de coleta.	31
Tabela 4 - Condições de amplificação para as três regiões do mtDNA analisadas.	33
Tabela 5 - Nome da espécie genes analisados e os respectivos número do Genbank.	35
Tabela 6 - Dados do polimorfismo e valores do teste de neutralidade para todos os genes analisados e para as duas espécies analisada <i>F. indicus</i> e <i>M. monóceros</i> .	35
Tabela 7 - Matriz dos valores $F_{ST}$ usando a distância par a par (diagonal inferior) e os seus valores de P (diagonal superior) para o gene COI na espécie <i>F. indicus</i> para o nível de significância de 0,05.	37
Tabela 8 - Resultados da Análise de Variância Molecular para o Gene COI na espécie <i>F. indicus</i> .	37
Tabela 9 - Distância mínima, média e máxima intraespecífica e distância mínima, média e máxima interespecífica, dados nominais.	55
Tabela 10 - Comparação da distribuição de distância para o vizinho mais próximo (NN), dados nominais.	55
Tabela 11 - Distância mínima, média e máxima intraespecífica e distância mínima, média e máxima interespecífica, (espécies separadas em linhagens).	57
Tabela 12 - Comparação da distância média e máxima intraespecífica com a distância do vizinho próximo (NN), (espécies separadas em linhagens).	58

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT .....	09
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Características viológicas dos peneídeos.....	20
1.2. Diversidade e estrutura genética e identificação molecular .....	22
1.3. Importância dos camarões para Moçambique .....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral .....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
2.3. Hipóteses.....	25
CAPITULO I.....	27
2. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DOS CAMARÕES PENEÍDEOS <i>Fenneropenaeus indicus</i> E <i>Metapenaeus monoceros</i> DA COSTA DE MOÇAMBIQUE BASEADAS NO mtDNA.....	28
Resumo .....	28
Abstract.....	28
2.1. Introdução.....	29
2.2. Material e Métodos.....	31
2.3. Resultados.....	34
2.4. Discussão .....	40
CAPÍTULO II.....	44
3. USO DO DNA BARCODING NA IDENTIFICAÇÃO DOS CAMARÕES PENEÍDEOS DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL DA COSTA DE MOÇAMBIQUE.....	45



Resumo .....	45
Abstract.....	45
3.1. Introdução .....	46
3.2. Material e Métodos.....	48
3.3. Resultados.....	50
3.4. Discussão .....	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
6. REFERÊNCIAS .....	65
ANEXO A – SEQUÊNCIAS GÊNICAS OBTIDAS PARA ESPÉCIES DO GENBANK. NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK, NOME DO GÊNERO E DA ESPÉCIE, DESIGNAÇÃO USADA NA ANÁLISE E LOCAL DE ORIGEM DA SEQUÊNCIA .....	74
ANEXO B - NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS POR LOCALIDADE E POR REGIÃO DO mtDNA, NOME DA ESPECIE.....	74
ANEXO C - SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO BOLD SYSTEMS, NOME DO GÊNERO E ESPÉCIE, CÓDIGO COM O QUAL A SEQUÊNCIA FOI DEPOSITADA .....	75
ANEXO D – SEQUÊNCIA DO GENE CYT B PARA AS ESPÉCIES <i>Fenneropenaeus indicus</i> E <i>Metapenaeus monoceros</i> .....	78
ANEXO E – SEQUÊNCIA DA REGIÃO D-LOOP PARA AS ESPÉCIES <i>Fenneropenaeus indicus</i> E <i>Metapenaeus monoceros</i> .....	79
ANEXO F - REDE DE HAPLÓTIPOS CORRESPONDENTE À REGIÃO DE CONTROLE DLOOP PARA A ESPÉCIE <i>F. indicus</i> .....	80
ANEXO G - REDE DE HAPLÓTIPOS CORRESPONDENTE À REGIÃO DE CONTROLE DLOOP PARA ESPÉCIE <i>M. monoceros</i> .....	81
ANEXO H – SEQUÊNCIAS DO GENE COI USADAS NA ANÁLISE DE DNA BARCODING .....	82



## 1. INTRODUÇÃO

Moçambique localiza-se na costa leste da África Austral e possui a terceira linha costeira mais extensa do continente africano, com cerca de 2.700 km (FAO, 2009). A rede hidrográfica do país é constituída por numerosos rios que deságuam, em sua maioria, no oceano Índico, formando vários estuários, o que torna esta a região costeira especialmente rica em recursos marinhos, dentre os quais se destacam os camarões peneídeos (FAO, 2007).

Os camarões peneídeos (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) possuem uma ampla distribuição em quatro regiões: a região Indo-Oeste do Pacífico, leste do Pacífico, oeste e leste do Atlântico (HOLTHUIS, 1980; DALL et al., 1990). A região Indo-Pacífico é o centro de origem é constituído por uma larga placa continental com um habitat mais adequado comparado ao do Atlântico. Deste modo, possui uma maior diversidade destes camarões, cujo número de espécies pode ser cinco vezes maior do que o encontrado no Atlântico (DALL et al., 1990; BRIGGS, 1999). No entanto, não existem barreiras fundamentadas que separem o oceano Índico e o leste do oceano Pacífico. Estas duas regiões são vistas como um bioma complexo Indo-Oeste-Pacífico (BRIGGS, 1999). Barreiras para a distribuição dos camarões peneídeos muitas vezes não são óbvias. Porém, a extensão territorial, gradiente de temperatura, profundidades e correntes oceânicas (DALL et al., 1990) podem restringir a dispersão das larvas pelágicas, ovos e organismos bentônicos (como é o caso dos camarões peneídeos) através das correntes marinhas. Este fato pode favorecer a estruturação genética dos organismos. De modo semelhante, eventos de vicariância (formação de barreiras físicas que desconectam uma região anteriormente contínua), tal como o fechamento de rotas marítimas, como, por exemplo, o fechamento do mar de *Tethys* (entre o Oceano Atlântico e o Pacífico, via Mar Mediterrâneo durante o Oligoceno/Mioceno) (HRBEK; MEYER, 2003) pode restringir a dispersão dos organismos marinhos, favorecendo a estruturação genética (KEIGWIN, 1978; COATES et al., 1992; TESKE et al., 2007).

Segundo a classificação taxonômica da família Penaeidae elaborada por Rafinezque Schmaltz (1815), são reconhecidos 17 gêneros que agrupam aproximadamente 200 espécies existentes nas quatro regiões oceânicas (DALL et al., 1990; CHAN et al., 2008). Muitos destes gêneros habitam águas costeiras, com exceção dos gêneros *Metapenaeopsis*, *Parapenaeus* e *Penaeopsis*, que se distribuem em águas profundas (DALL et al., 1990). A região Indo-Oeste Pacífico (Indo-West-Pacifico-IWP) possui 11 dos 17 gêneros (Tabela 1), nove dos quais incluem 24 espécies que ocorrem na região sudoeste do oceano Índico (South West Indian Ocean-SWIO) (Tabela 1: DALL et al., 1990).

Outra classificação taxonômica desta família foi desenvolvida por Pérez Farfante e Kensley (1997). Estes autores sugeriram um total de 24 gêneros (Tabela 1), onde o gênero *Trachypenaeus* foi dividido em cinco gêneros e *Penaeus*, em seis. Várias análises filogenéticas com base em marcadores mitocondriais (BALDWIN et al., 1998; MAGGIONI et al., 2001; LAVERY et al., 2004; QUAN et al., 2004; VOLOCH; FREIRE; RUSSO; 2005; CHAN et al., 2008), genes nucleares (MA; CHAN; CHU; 2009) e combinação de genes mitocondriais e nucleares (MA; CHAN; CHU, 2011) questionaram a validade da classificação feita por estes dois autores. Segundo Dall (2007), faz-se necessária uma revisão taxonômica com base nas evidências filogenéticas para o tradicional gênero *Penaeus* (incluindo *Penaeus*, *Fenneropenaeus*, *Litopenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Melicertus* e *Marsupenaeus*) (DALL, 2007; FLEGEL, 2007; CHAN et al., 2008; MA; CHAN; CHU, 2011).

Tabela 1 - Revisão da classificação taxonômica da família Penaeidae e listagem dos gêneros que ocorrem na região IWP e SWIO e das espécies que habitam as águas da região SWIO.

<b>Gêneros antigos (DALL et al., 1990)</b>	<b>Gêneros adicionais (Perez Farfante e Kensley)</b>	<b>Gêneros (IWP)</b>	<b>Gêneros (SWIO)</b>	<b>Especies (SWIO)</b>
<i>Atypopenaeus</i>	<i>Farfantepenaeus</i>	<i>Atypopenaeus</i>	<i>Macropestasma</i>	<i>Macropestasma africanus</i> Malss 1913
<i>Macropetasma</i>	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>Macropetasma</i>	<i>Metapenaeopsis</i>	<i>Metapenaeopsis</i> Man 1911
<i>Metapenaeopsis</i>	<i>Litopenaeus</i>	<i>Metapenaeopsis</i>	<i>Metapenaeus</i>	<i>Metapenaeopsis mongiensis</i> M.J. Rathbun 1902
<i>Metapenaeus</i>	<i>Marsupenaeus</i>	<i>Metapenaeus</i>	<i>Parapenaeopsis</i>	<i>Metapenaeopsis scotti</i> Champion 1973
<i>Parapenaeopsis</i>	<i>Melicertus</i>	<i>Parapenaeopsis</i>	<i>Parapeanaeus</i>	<i>Metapenaeopsis provocatória</i> Racek e dall 1965
<i>Parapenaeus</i>	<i>Megokris</i>	<i>Parapenaeus</i>	<i>Penaeopsis</i>	<i>Metapenaeopsis quiquedentata</i> De Man 1907
<i>Penaeopsis</i>	<i>Miyadiella</i>	<i>Penaeopsis</i>	<i>Trachypenaeopsis</i>	<i>Metaapenaeus monoceros</i> Fabricius 1798
<i>Trachypenaeopsis</i>	<i>Trachysalambria</i>	<i>Trachypenaeopsis</i>	<i>Trachypeaneus</i>	<i>Metapenaeus stebbingi</i> Nobili 1904
<i>Trachypeanaeus</i>	<i>Rimopenaeus</i>	<i>Trachypeanaeus</i>	<i>Penaeus</i>	<i>Parapenaeopsis acclivirostris</i> Alcock 1905
<i>Penaeus</i>		<i>Penaeus</i>		<i>Parapenaeus fisóides</i> Crosnier 1985
<i>Heteropenaeus</i>		<i>Heteropenaeus</i>		<i>Parapeaneus investigatoris</i> Alcock e Anderrson 1899
<i>Protrachypene</i>				<i>Parapenaeus longipes</i> Alcock 1905
<i>Xiphopenaeus</i>				<i>Parapenaeus sexuberculatus</i> Kubo 1949
<i>Artemesia</i>				<i>Penaeopsis balssi</i> Ivanov e Hassan 1976
<i>Tanypenaeus</i>				<i>Trachypenaeopsis richtersii</i> Miers 1884
<i>Funchalia</i>				<i>Trachypeaneus curvirostris</i> Stimpson 1860
<i>Pelagopenaeus</i>				<i>Trachypeaneus sedili</i> Hall 1961
				<i>Penaeus monodon</i> Fabricius 1798
				<i>Penaeus canaliculatus</i> Olivier 1811
				<i>Penaeus indicus</i> H. Milne Edwards 1837
				<i>Penaeus japonicus</i> Bate 1888
				<i>Penaeus latisulcatus</i> Kishinouye 1896
				<i>Penaeus marginatus</i> Randall 1840
				<i>Penaeus semisulcatus</i> De Haan 1844

Segundo Fisher et al. (1990), que consideraram a classificação taxonômica feita por Rafinezque Schmaltz (1815), em Moçambique sete gêneros ocorrem e 19 espécies. A estes gêneros e espécies somam-se duas espécies, possivelmente exóticas, recentemente registradas na Baía de Maputo, passando a 21 espécies (Tabela 2). Porém, o número de gêneros altera se considerarmos a classificação feita por Pérez Farfante; Kensley (1997), passando a 11. Ainda, se tivermos em conta a última classificação feita por Sakay; Sinonimya (2011), voltamos e ter uma alteração no número de gêneros, passando a 12 (DE GRAVE; FRANSEN, 2011).

Tabela 2 - Espécies que ocorrem em Moçambique, incluindo as exóticas.

Classificação antiga	
<i>Metapeaneopsis hilarula</i> (De Man 1911a)	Mantém-se
<i>Metapeneaeopsis mogiensis</i> (Rathbun, 1902)	"
<i>Metapeneaeopsis philippii</i> (Bate, 1881)	"
<b><i>Metapeneaeus monoceros</i> (Fabricius, 1798)</b>	"
<b><i>Metapeneaeus stebbingi</i> Nobili, 1904</b>	"
<i>Parapeneaeopsis acclivirostris</i> Alcock, 1905	"
<i>Parapeneaeus fissurus</i> (Bate, 1881)	"
<i>Parapeneaeus investigatoris</i> Alcock & Anderson, 1899	"
<i>Parapeneaeus longipes</i> Alcock, 1905	"
<i>Penaeopsis balsi</i> Ivanov & Hassan, 1976	"
<i>Penaeus canaliculatus</i> Olivier, 1811	<b><i>Melicertus canalicatus</i></b>
<b><i>Penaeus indicus</i> H. Milne Edwards, 1837</b>	<b><i>Fenneropaneus indicus</i> H. Milne Edwards, 1837</b>
<b><i>Penaeus japonicus</i> Bate 1888</b>	<b><i>Marsupeneaeus japonicus</i> Bate, 1888</b>
<b><i>Peanaeus latisulatus</i> Kishinouye, 1896</b>	<b><i>Melicertus latisulcatus</i> Kishinouye, 1896</b>
<i>Penaeus marginatus</i> Randall, 1840	<i>Melicertus marginatus</i> Randall, 1840
<b><i>Penaeus monodon</i> Fabricius, 1798</b>	<b>Mantém-se</b>
<b><i>Penaeus semisulcatus</i> De Haan, 1844</b>	"
<i>Trachypeneaeus curvirostris</i> (Stimpson, 1860)	"
<i>Trachypeneaeus sedilli</i> Hall, 1961	<i>Megokris sedilli</i> Hall, 1961
<b>*<i>Metapeneaeus dobsoni</i> (Miers, 1878)</b>	<b>Mantém-se</b>
<b>*<i>Parapeneaeopsis sculptilis</i> (Heller,</b>	<b>*<i>Mierspenaeopsis sculptilis</i> (Heller, 1862a)</b>

As espécies analisadas neste trabalho estão destacadas em negrito. As duas com asterisco são exóticas.

## 1.1 Características biológicas dos camarões peneídeos

A maior parte dos camarões peneídeos habita águas rasas e costeiras de regiões tropicais e subtropicais (DALL et al., 1990). Alguns membros desta família, principalmente dos gêneros *Parapenaeus* e *Penaeopsis*, ocorrem em águas profundas superiores a 750 m. Geralmente os peneídeos são bentônicos, preferindo fundos arenosos e lodosos. Algumas espécies do gênero *Funchalia* são pelágicas e outras habitam recifes de corais (gêneros *Heteropenaeus*, *Trachypenaeopsis* e algumas espécies do gênero *Metapenaeopsis*). O tamanho do corpo varia de 2,5 a 35 cm de comprimento. O sexo é facilmente distinguido pela presença de um órgão copulador (petasma) que se encontra no primeiro par de pleópodes (apêndices abdominais) em machos, enquanto as fêmeas possuem o téllico, uma estrutura encontrada na face ventral nos esternites correspondentes aos dois pares posteriores de pereiópodes. As formas do petasma e do téllico são úteis para a identificação das espécies de camarão (DALL et al., 1990; CARPENTER; NEIM, 1998).

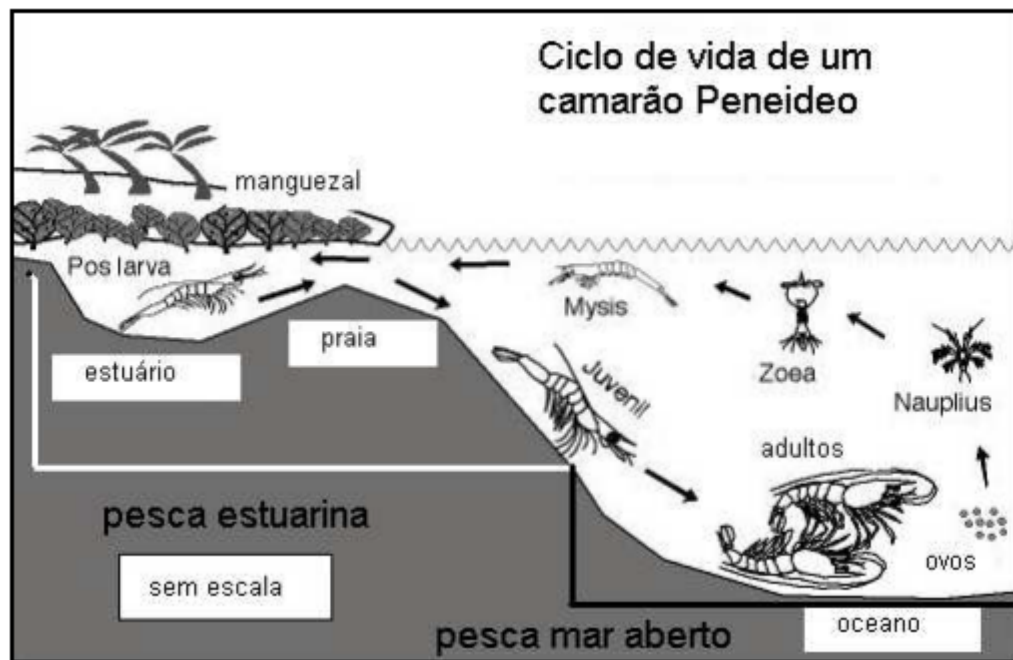
Baseados na morfologia do télson, os peneídeos podem ser divididos em dois grupos: um grupo com o télson fechado (*Penaeus*, *Fenneropenaeus*, *Marsupenaeus*, *Melicerus*, *Farfantepenaeus*, e *Metapenaeus*) e o outro, constituído por aqueles com o télson aberto (*Litopenaeus*). Estes possuem ainda sulcos com protuberâncias que facilitam o contato com os espermatóforos, enquanto o primeiro grupo possui placas laterais que conduzem para o receptáculo seminal, onde o espermatóforo é depositado (PRIMAVERA, 1979; YANO et al., 1988).

O comportamento sexual difere entre estes dois grupos. As espécies com o télson fechado copulam com as gonadas ainda imaturas, enquanto as espécies com télson aberto o fazem depois da maturação do ovário. A fertilização é externa, independentemente da forma do télson.

Em geral, os peneídeos desovam em águas oceânicas, porém as distâncias dependem da hidrologia local, sobretudo da influência da água doce vinda dos rios ao longo da costa (TEIKWA; MGAYA, 2003). Grande parte dos membros desta família possui um ciclo de vida similar com duas fases principais: uma estuarina e outra marinha (Figura 1). Dependendo da preferência do habitat (demersal ou pelágico) durante as fases pós-larva, juvenil, adulto e ovos maduros (DALL et al., 1990), existem 4 tipos de ciclo de vida, que envolvem os estágios nauplio, protozea, mysis e fase pós-larva, seguido da fase juvenil e do estágio adulto. O ciclo do tipo 1 apresenta um ciclo de vida exclusivamente estuarino. As pós-larvas deste tipo migram para águas com baixa salinidade, local onde se alimentam e crescem, depois retornam

para águas com salinidades mais elevadas, e se juntam às populações mais adultas. No tipo 2, as espécies necessitam tanto do estuário como do mar aberto para completar seu ciclo de vida. As pós-larvas deste grupo preferem ambientes estuarinos, enquanto os juvenis e os subadultos migram do estuário para o mar (FORBES; DEMETRIADE, 2005). O ciclo de vida das espécies do tipo 3 está restrito às zonas costeiras abrigadas, com salinidade elevada. Já no tipo 4, as espécies completam seu ciclo de vida no alto mar (DALL et al., 1990).

Figura 1 - Ciclo de vida dos camarões pertencentes à família Penaeidae



Fonte: (GARCIA E LE RESTE, 1987)

Grande parte dos camarões do gênero *Penaeus* e *Metapenaeus* possui o ciclo de vida do tipo 2, onde as larvas, juvenis e adultos migram do estuário para o alto mar. As larvas e pós-larvas podem migrar passivamente (correntes marinhas) e ativamente (com movimento vertical), mas possivelmente não nadam contra as correntes. As larvas são transportadas através das correntes, enquanto os juvenis e adultos migram ao acaso pelas correntes marinhas, nadando contra elas ou através das migrações bentônicas (DALL et al., 1990; CRIALES et al., 2005).

Os juvenis de *F. indicus*, *M. monoceros* e *P. monodon* são mais abundantes na região costeira e estuarina, enquanto os adultos abundam no mar aberto, em regiões mais distantes da costa (TEIKWA; MGAYA, 2003).

*F. indicus* tem um ciclo de vida anual. Em Moçambique esta espécie desova entre agosto a novembro no alto mar (PALHA DE SOUSA; BRITO; HOWEL, 2005). Depois da eclosão as larvas desta espécie são movidas para as zonas costeiras à medida que se desenvolvem. Crescem a partir dos estágios pós-larval ao estágio sub-adulto. Com sua carapaça medindo cerca de 20 mm e peso de 7 a 10 g, migram dos estuários para o oceano. Neste local, crescem até cerca de 15 g e o período de recrutamento, inicia-se de novembro até abril (BRITO, 2001).

A espécie *M. monoceros* tem um ciclo de vida anual semelhante ao de *F. indicus*. Tem vários períodos de desova que ocorrem em águas oceânicas a variadas distâncias da costa. As larvas são movidas para as zonas costeiras em áreas com baixa profundidade, onde se fixam as pós-larvas. Nestes locais ocorre o seu desenvolvimento. A migração ativa dos locais de desenvolvimento para o alto mar ocorre na estação quente, quando o camarão apresenta cerca de 10 g. O recrutamento dá-se ao longo de todo o ano, apresentando um pico nos meses de abril e maio (BRITO, 2010). A temperatura e a salinidade parecem estimular o regresso dos juvenis ao mar, reiniciando o ciclo a partir da sua maturação (CARPENTER; NIEM, 1998).

## **1.2. Diversidade e estrutura genética e identificação molecular**

A diversidade genética pode ser explicada pela existência de diferentes genótipos numa população (VILA; MALDONADO; WAYNE, 1997). A variabilidade genética é um elemento importante que confere à população habilidade para adaptação a um determinado ambiente (REYNOLDS; MCGLATHERY; WAYCOTT, 2012). Na ausência de diferenciação genética, as variações genéticas dentro de uma espécie em uma área geográfica, podem se estender em toda sua distribuição e o fluxo gênico ou migrações efetivas dentro de uma área geográfica podem ser extensivos e os indivíduos da espécie podem migrar e acasalar ao acaso sem restrições (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005). O conhecimento sobre o fluxo gênico e da estrutura genética entre as populações tem importantes implicações não apenas na ecologia e biologia evolutiva, mas também para a conservação e gestão da biodiversidade (COWEN; SPONAUGLE, 2009).

Segundo Fisher (1930), “a taxa de mudança evolutiva na população é proporcional à quantidade de diversidade genética disponível”. A variação genética deve ser preservada,



tanto a curto como em longo prazo porque ela garante a sobrevivência das espécies. A diversidade genética representa o nível primário da biodiversidade.

A identificação acurada de espécies é uma atividade importante que deve ser usada para uma gestão sustentada, assim como para o monitoramento das populações, sobretudo as de grande valor econômico (WARD, 2000; BEERKIRCHER et al., 2009). Neste contexto, a utilização de marcadores moleculares tem sido empregada com sucesso por vários pesquisadores devido às inúmeras vantagens que eles apresentam (ABREU et al., 2010). Por exemplo, eles permitem identificar espécies independentemente do seu estágio de vida e nos casos mais críticos em que um ou mais caracteres do indivíduo são removidos e fica difícil o seu reconhecimento (DOMINGUEZ; AMORIM; HILSDORF, 2013). Pascoal et al. (2011) identificaram o camarão *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* e *F. indicus* utilizando o gene ribossomal 16S rRNA. Wu et al. (2011), com base em marcadores mitocondriais, identificaram uma espécie exótica de peixe: Sailfin Catfish (*Pterygoplichthys*, *Loricariidae*) em Taiwan. Na Nova Zelândia, pesquisadores identificaram uma espécie invasiva Norte Americana de *Daphnia* ‘pulex’ usando análises morfológicas e com base no mtDNA COI (DUGGAN et al., 2012).

Em geral, as pesquisas envolvendo marcadores genéticos são escassas em Moçambique, apesar da sua rica biodiversidade em espécies marinhas, sobretudo de camarões peneídeos que são de suma importância para a economia do país.

### **1.3. Importância dos camarões para Moçambique**

Os camarões peneídeos constituem um recurso pesqueiro de grande importância econômica mundial tanto para indústria pesqueira quanto para a de cultivo (DALL et al., 1990; CHAN, 1998; LEUNG; ENGLE, 2006; FAO, 2007). Em Moçambique a pesca do camarão é uma das bases da sua economia, contribuindo com cerca de 13 % da receita de exportação. O setor pesqueiro emprega mais de 90 mil pessoas (pesca, coleta, processamento e comercialização), das quais 70 mil no setor marítimo e 20 mil na pesca de água doce (FAO, 2007). Além de exportar o camarão proveniente de indústria pesqueira, Moçambique conta também com a exportação de camarões provenientes de cultivo (FAO, 2007; ASCLME/SWIOFP 2012). Assim, uma gestão sustentável deste recurso reveste-se de extrema importância para o país.

Recentemente, na Baía de Maputo tem sido registrada a presença de duas espécies de camarão não antes observadas na costa moçambicana. Este fato tem provocado grande preocupação por parte da comunidade local, porque uma das espécies apresenta tamanho bem reduzido em relação às espécies nativas. Além disso, a sua presença tem sido acompanhada por uma redução drástica das espécies locais.

A introdução de espécies exóticas com potencial bioinvasor tem sido descrita como sendo uma das maiores causas para a perda da biodiversidade, e nos casos mais graves pode levar à extinção de outras espécies presentes no habitat (PEREZ et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2005; ZHANG; CHEN, 2011; ATES et al., 2013). Esta perda surge como consequência da competição entre as espécies invasoras e as nativas, resultando na substituição destas últimas. A predação e a hibridação são também consideradas como um problema causado por espécies invasoras que podem conduzir à perda da biodiversidade (Pimentel, 2002).

Apesar de sua importância para a economia do país, ainda não há estudos sobre o camarão principalmente em nível genético. A grande quantidade de informação existente apresenta-se sob a forma de dados de coleta, programas de monitoramento, levantamento de atividades de pesca do passado, projetos de pesquisa e outros. Um exemplo disso é apresentado na pesquisa levada a cabo por ASCLME/SWOFP (Aguilhas and Somali Current Large Maine Ecosystems Project and Southwest Indian Ocean Fisheries Project, 2012) que mostrou a existência de lacunas de dados científicos da fauna costeira da região.

Tanto para o desenvolvimento da aquicultura quanto para a escolha dos locais e períodos de defeso, há necessidade da realização de estudos sobre a diversidade genética e a estrutura populacional. Estes se revestem de informações importantes para o monitoramento dos recursos pesqueiros que contribuirão tanto para traçar estratégias no uso sustentável e conservação deste recurso, como na orientação em programas direcionados à aquicultura.

Com o aumento do esforço de captura do camarão causado pela crescente industrialização da pesca, tem havido uma forte pressão sobre os estoques naturais, conduzindo a uma redução dos mesmos. Por outro lado, a gestão pesqueira do camarão do Banco de Sofala, região centro do país, tem sido realizada de forma separada da Baía de Maputo. Este fato deve-se à aparente separação geográfica que sugere que sejam estoques distintos. Contudo, a dinâmica da circulação oceânica e o comportamento de dispersão larval de algumas espécies sugerem que pode estar ocorrendo algum fluxo gênico do norte ao sul da costa moçambicana. Por outro lado, a presença de espécies exóticas constitui uma ameaça para as espécies nativas, sobretudo as de maior valor econômico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Estudar a variabilidade genética das espécies de camarão *Fenneropenaeus indicus* e *Metapenaeus monoceros* e identificar molecularmente as espécies que ocorrem na costa Moçambicana.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar a diversidade e a estrutura genética das espécies *F. indicus* e *M. monoceros* da costa moçambicana
- Identificar as espécies de peneídeos ocorrentes na costa moçambicana através do DNA Barcoding.

### 2.3. Hipóteses

- Existe estruturação genética Norte-Sul ao longo da costa de Moçambique de peneídeos, que justifica o manejo separado desses recursos pesqueiros; Devido a aparente separação geográfica entre o Banco de Sofala e a Baía de Maputo, que sugerem que haja estoques distintos de camarões peneídeos.
- Não há incertezas taxonômicas entre os peneídeos que ocorrem na costa moçambicana. Os peneídeos ocorrentes na costa de Moçambique estão corretamente identificados taxonomicamente.

O trabalho foi elaborado em capítulos organizados da seguinte forma:

**Capítulo 1: “Diversidade e estrutura genética populacional dos camarões peneídeos *Fenneropenaeus indicus* e *Metapenaeus monoceros* da Costa de Moçambique baseado no mtDNA”.**

Os principais achados deste capítulo foram: Alta variabilidade genética, ausência de estruturação populacional e evidência de uma recente expansão populacional para as duas espécies estudadas.

## **Capítulo 2: “Uso do DNA *barcoding* na identificação dos camarões peneídeos de importância comercial da Costa de Moçambique”**

Mediante o DNA *Barcoding*, foi possível identificar as sete espécies exploradas comercialmente em Moçambique, assim como duas prováveis espécies exóticas de camarões não antes descritas na costa de Moçambique. Além disso, sugere-se a ocorrência de possíveis espécies crípticas.



## **CAPITULO I**

## 2. DIVERSIDADE E AUSENCIA DE ESTRUTURA OU CONECTIVIDADE GENÉTICA POPULACIONAL DOS CAMARÕES PENEÍDEOS *Fenneropenaeus indicus* E *Metapenaeus monoceros* DA COSTA DE MOÇAMBIQUE BASEADAS NO mtDNA

### Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional das espécies *F. indicus* e *M. monoceros*. Foram coletadas 160 amostras ao longo da costa de Moçambique e analisados os genes COI, Cyt b e a região de controle D-loop. Foi observada uma elevada diversidade genética, sendo que o D-loop apresentou os valores mais elevados (*F. indicus*: Hd=1; h=13; pi=0,0133; *M. monoceros*: Hd=0,99; h=24; e pi=0,0092). O D-loop apresentou haplótipos únicos, os valores do teste D de Tajima e Fs de Fu foram negativos e significativos para os genes COI e Cyt b. As curvas de distribuição *mismatch* sugerem que as duas espécies passaram por uma expansão populacional recente de 10,397 e 28,418 anos para *F. indicus* e *M. monoceros*, respectivamente. A AMOVA referente aos genes COI e Cyt b mostrou que mais de 99% da variação ocorre dentro das populações. Os valores de F<sub>ST</sub> par a par indicaram não estruturação populacional. A natureza das correntes marinhas ao longo do canal de Moçambique, bem como a ausência completa de barreiras físicas e/ou ambientais podem ser os principais fatores que influenciam a não estruturação de *F. indicus* e *M. monoceros*.

**Palavras-chave:** Variabilidade Genética, Penaeidae, Haplótipos, Expansão Populacional, COI, Cyt b, Dloop.

### Abstract

The purpose of this work was to evaluate the genetic diversity and population structure of *F. indicus* and *M. monoceros*. 160 samples were collected along the Mozambican coast. The genes, COI, Cyt-b, and control region D-loop were analyzed. High genetic diversity was observed, however D-loop showed the greatest values (*F. indicus*: Hd=1; h=13, pi=0,0133; *M. monoceros*: Hd=0,99; h=24; and pi= 0,0092). D-loop showed unique haplotypes and Tajima's D and Fu's Fs test values were negative and significant for COI and Cyt-b.

Mismatch distribution suggested population expansion (10,397 - 28,418) years ago for *F. indicus* and *M. monoceros*, respectively. AMOVA results for COI and Cyt-b have shown more 99% of the variation occurs within the populations. Pairwise *F*<sub>st</sub> values suggested no population genetic structuring. The marine currents along the Mozambique channel, as well as the lack of physical and/or environmental barriers, may be the factors influencing the non-structuring of *F. indicus* and *M. monoceros*.

**Keywords:** Genetic variability, Penaeidae, cryptic species, population expansion, COI, Cytb, DLoop

## 2.1. Introdução

A pesca do camarão tem sido considerada um dos pilares da economia nacional de Moçambique, sendo que as espécies mais comuns são: *Penaeus monodon* (“Giant Tiger prawn”), *Melicertus latisulcatus* (“Western King prawn”), *Metapenaeus monoceros* (“Speckled shrimp”), *Marsupenaeus japonicus* (“Kuruma prawn”), *Fenneropenaeus indicus* (“Indian White prawn”) e *Penaeus semisulcatus* (“Green Tiger prawn”). Dados recentes de pesca mostraram predominância de *F. indicus* e *M. monoceros*, provavelmente por serem as espécies mais abundantes dentro dos grupos dos peneídeos existentes nesta região (RÖNNBÄCK et al., 2002). No entanto, atualmente as duas espécies parecem se encontrar ameaçadas em Moçambique. Os dados de pesca têm mostrado um declínio na pesca ao longo da costa moçambicana, principalmente devido à super-exploração (MINISTÉRIO DA PESCA DA REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE, 2012).

Os camarões peneídeos compreendem um grupo diverso de espécies que habitam ambientes estuarinos (DE CROOS; PÁLSSON, 2010), distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (DALL et al., 1990; CHAN, 1998). Possuem uma importância econômica mundial tanto na indústria pesqueira como na aquicultura. Porém, muitas espécies encontram-se sobre-explotadas nas regiões onde elas ocorrem (DE CROSS; PÁLSSON, 2011; MINISTÉRIO DAS PESCAS DA REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE, 2012) e as consequências genéticas sobre suas populações são pouco conhecidas. É bem sabido que a diversidade genética constitui uma base para futuras adaptações das espécies e para a flexibilidade evolutiva em resposta às mudanças das condições ambientais. A avaliação da

diversidade genética pode ser um passo crucial para uma gestão sustentável e conservação das populações.

Muitas espécies marinhas, incluindo os peneídeos, possuem grandes populações que passam por estágios larvais pelágicos. O grande tamanho populacional pode ser uma das características responsáveis para a conectividade destas populações numa larga escala espacial (COUCEIRO et al., 2007).

O ciclo de vida dos membros da família Penaeidae envolve larvas plantônicas com uma variedade de fases desde naupliu, protozoa, mysis e pós-larva, seguido pelos estágios juvenis e adultos. Devido a estes diferentes estágios, os peneídeos ocupam diferentes habitats e a migração é um componente necessário no seu ciclo de vida (MACIE, 2004). Estudos destes camarões demonstraram que eles apresentam diferentes padrões de migração nos quais as larvas e pós-larvas migram das áreas de desova para os viveiros (berçários) e os juvenis dos viveiros para o mar aberto (DALL et al., 1990). No entanto a dispersão das larvas pode ser afetada por diferentes fatores que incluem gradiente de temperatura (abaixo de 15°C), correntes e profundezas oceânicas que podem restringir a dispersão das larvas, dando origem a populações estruturadas (DALL et al., 1990).

Devido a uma aparente separação geográfica entre o Banco de Sofala (região centro de Moçambique) e a Baía de Maputo (região sul do país), que sugerem que haja estoques distintos de camarões peneídeos, a gestão pesqueira tem sido realizada de forma separada nestas duas áreas. No entanto, a dinâmica da circulação oceânica e a dispersão larval sugerem que algum fluxo gênico pode estar ocorrendo da direção norte para o sul da costa de Moçambique.

*F. indicus* é uma espécie euritérmica e eurihalina tolerando uma ampla variação de temperatura e salinidade (DEL MUNDO, 2000). Apesar de ocorrer em profundidades de até 90 m, é mais comumente encontrado em áreas costeiras rasas com 30 m de profundidade. Os juvenis desta espécie são mais abundantes em regiões costeiras e estuarinas, enquanto que os adultos são usualmente encontrados em mar aberto, em áreas mais distantes da costa (TEIKWA; MGAYA, 2003).

*M. monoceros* apesar de ser uma espécie marinha, pode também ser encontrada em água salobra e água doce. Os juvenis desta espécie são abundantes em fundos lodosos ao longo da costa, enquanto que os adultos podem ser encontrados tanto em fundos lodosos como arenosos (SUDHAKARA; RADHAKRISHNAN; JOSE, 2013).

Nas duas espécies, a dispersão larval pelágica pode desempenhar um papel importante na homogeneização genética entre as populações. O conhecimento de quão diversa é uma



população e de como se encontra distribuída a variação genética entre as populações é uma ferramenta poderosa para uma gestão eficiente das espécies que se encontram sobre-explotadas. Apesar da grande importância econômica que os peneídeos possuem para Moçambique, não existem trabalhos na literatura científica sobre aspectos genéticos. Deste modo, este é o primeiro trabalho direcionado ao estudo da diversidade e estrutura genética das populações *F. indicus* e *M. monoceros* que será muito útil para as políticas de conservação em longo prazo e para a gestão da pesca dessas duas espécies de camarão mais importantes da costa de Moçambique.

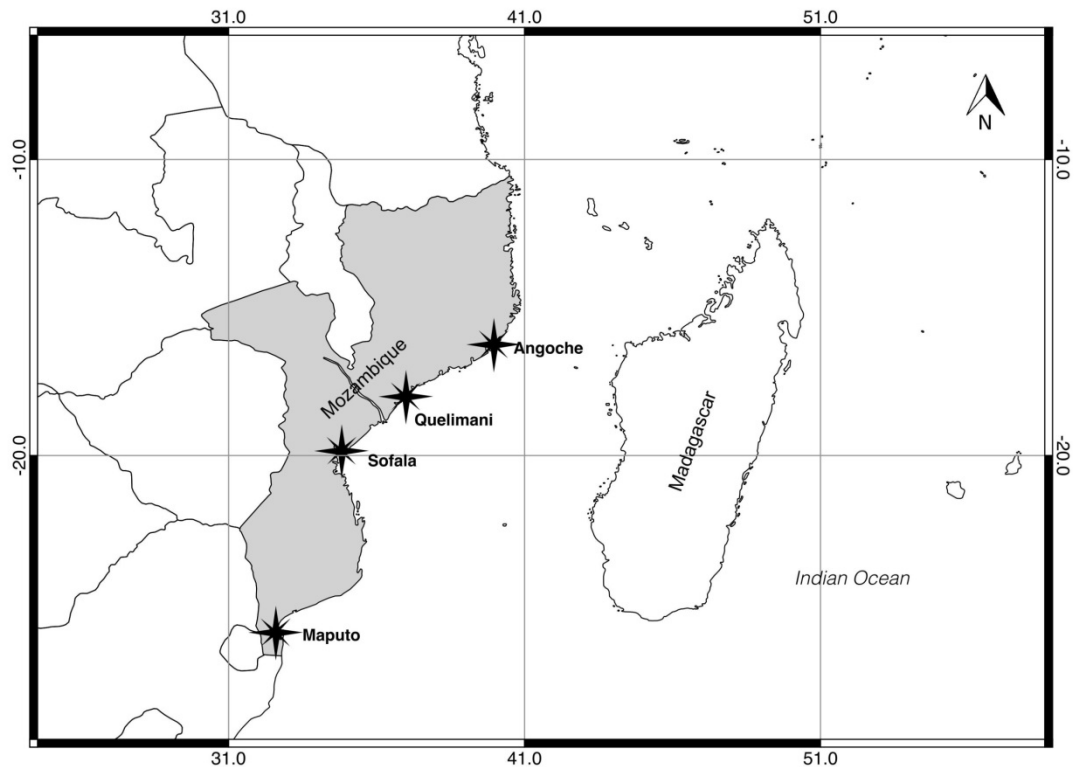
## 2.2. Material e Métodos

Um total de 160 amostras (80 de *F. indicus* e 80 de *M. monoceros*) foram coletadas ao longo da costa de Moçambique nos principais centros de pesca da Baía de Maputo e do Banco de Sofala, Zambézia, e Angoche (Tabela 3, Figura 2) nos seguintes períodos: julho de 2010, abril a junho de 2011 e junho de 2012. Um pedaço de tecido muscular (aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>) foi retirado, imediatamente conservado em etanol a 95% e mantido a uma temperatura de 4°C até a extração do DNA, que foi conduzida pelo método descrito por Sambrook; Fritsh (1989).

Tabela 3 - Números de indivíduos, espécies analisadas, local da coleta e coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

n	Espécie	Localidade	Coordenadas Geográficas	
20	<i>F. indicus</i>	Maputo	(S) 26° 11' 30''	(E) 32 <sup>a</sup> 45' 30''
20	<i>M. monoceros</i>	”	”	”
20	<i>F. indicus</i>	Sofala	(S) 19° 50' 29,3''	(E) 34° 54' 10,3''
20	<i>M. monoceros</i>	”	”	”
20	<i>F. indicus</i>	Quelimane	(S) 17° 47' 100''	(E) 37° 11' 115''
20	<i>M. monoceros</i>	”	”	”
20	<i>F. indicus</i>	Angoche	(S) 16° 07' 7,27''	(E) 34° 49' 47,2''
20	<i>M. monoceros</i>	”	”	“

Figura 2 - Mapa de Moçambique indicando os pontos de coleta para as duas espécies analisadas



Três regiões do mtDNA: Citocromo Oxidase c subunidade I (COI), Citocromo b e a região de controle (D-Loop) foram amplificadas usando os oligonucleotídeos desenvolvidos por Marques *et al* (in prep). Um segmento COI com 780 pb foi amplificado de acordo com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 55 segundos e 72°C por 1 minuto seguidos de 72°C por 30 minutos de extensão final.

Para o gene Cyt-b com 561 pb, foram obedecidas as seguintes condições de amplificação: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 55 segundos, e 72°C por 45 segundos, seguidos de 72°C por 10 minutos de extensão final.

Para a região de controle D-Loop, com 932 pb, as seguintes condições de amplificação foram obedecidas: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 55 segundos, e 72°C por 1 minuto, seguidos de 72°C por 30 minutos de extensão final. As

reações de amplificação para os três *loci* encontram-se descritas na Tabela 4. Todas as reações de amplificação foram conduzidas no termociclador (Applied Biosystems; veriti™ 96 well).

Tabela 4 - Condições de amplificação para os três regiões do mtDNA analisados

<b>Gene</b>	<b>Reagente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Volume final = 30µl</b>
<b>COI</b>	H2O MilliQ		17,3µl
	Buffer	10X	3,0µl
	Mgcl <sub>2</sub>	2,5mM	2,4 µl
	dNTP	2,5mM	2,4 µl
	P. Forward	10 pmoles	0,9µl
	P.reverse	10pmoles	0,9µl
	<i>Taq platinum</i>	1	0,1µl
	DNA	50ng/µl	3,0µl
<b>Cyt b</b>	H2O MilliQ		18,8µl
	Buffer	10X	3,0µl
	Mgcl <sub>2</sub>	2,5mM	2,4 µl
	dNTP	2,5mM	2,4µl
	P. Forward	10 pmoles	0,9µl
	P.reverse	10pmoles	0,9µl
	<i>Taq platinum</i>	1	0,1µl
	DNA	50ng/µl	1,5µl
<b>Dloop</b>	H2O MilliQ		16,1µl
	Buffer	10X	3,0µl
	Mgcl <sub>2</sub>	2,5mM	2,4µl
	dNTP	2,5mM	2,4µl
	P. Forward	10 pmoles	1,5µl
	P.reverse	10pmoles	1,5µl
	<i>Taq platinum</i>	1	0,1µl
	DNA	50ng/µl	3,0µl

Os fragmentos foram sequenciados no sentido forward na Macrogen Inc. (ABI 3730 XL Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas foram alinhadas usando o software ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBRON, 1994), implementado no programa Geneious R6 (KEARSE et al., 2012). O número dos sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (Hi), número médio de diferenças nucleotídicas (K), o teste D de Tajima (D) e teste (Fs) de Fu, foram calculados no DnaSP 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A análise das curvas de distribuição *mismatch* foi realizada no DnaSP 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e a soma dos desvios dos quadrados (SSD) foi obtida no ARLEQIN 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). O tempo de expansão populacional para o gene COI foi calculado com base na fórmula  $\tau = 2 \mu t$  onde t é o tempo em gerações;  $\mu$  é a taxa de mutação por sequência e por geração (ROGERS; HARPENDING, 1992). A taxa de mutação considerada foi  $\mu = 1.5\%$  por milhão de anos (BALDWIN et al., 1998). Os valores de Tau foram calculados no DnaSP Ver. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009), considerando 1 ano como tempo de geração (DE CROOS; PÁLSSON, 2010).

Para testar a hipótese da estrutura genética, os valores de  $F_{ST}$  par a par ( $p < 0,05$ ; 1023 permutações) e análise da variância molecular (AMOVA; EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) foram estimadas no programa ARLEQIN 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). A rede de haplótipos foi construída usando Network 4.5.1.6 (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999).

### 2.3. Resultados

As sequências de todos os indivíduos analisados foram depositadas no Genbank, (Tabela 5), (Anexo D e E). Sequências da região de controle D-Loop obtidas de *F. indicus* e de *M. monoceros* apresentaram praticamente haplótipos únicos (Tabela 6). De uma forma geral, a região D-loop apresentou valores elevados em todos os parâmetros analisados: Hd=1 para *F. indicus* e Hd=0,99 para *M. monoceros*. O gene COI apresentou valores mais baixos em alguns parâmetros: Hd=0,806 para *F. indicus* e Hd=0,638 para *M. monoceros* (Tabela 6). No anexo B são apresentados os números de indivíduos analisados por localidade e por região do mtDNA avaliada.

Tabela 5 - Nome da espécie, genes analisados e os respectivos número do GenBank

<b>Espécie</b>	<b>Gene</b>	<b>Número do GenBank</b>
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	COI	KP688355-KP688365
" "	COI	KP970362-KP970418
" "	COI	KP297902-KP297906
" "	COI	KM508834-KM508837
" "	Cyt b	KP970419-KP970458
" "	Dloop	KP970509-KP970521
<i>Metapenaeus monoceros</i>	COI	KP970302-KP970361
" "	COI	KM508839-KM508843
" "	COI	KP297907-KP297911
" "	Cyt b	KP970459-KP970508
" "	Dloop	KP970522-kp970549

Tabela 6 - Dados do polimorfismo e valores do teste de neutralidade para todos os genes analisados e para as duas espécies analisada *F. indicus* e *M. monoceros*

<b>Espécies</b>	<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>pb</b>	<b>s</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b>Pi</b>	<b>k</b>	<b>D</b>	<b>Fs</b>
	Dloop	13	932	52	13	1	0,0133	12,37	-1,237	-4,852
<i>F. indicus</i>	COI	77	760	58	39	0,806	0,0024	1,91	-2,78*	- 54,02*
	Cyt b	40	561	45	24	0,826	0,0011	2,76	-2,66*	- 20,801
	Dloop	25	925	49	24	0,99	0,0092	8,51	-1,325	-16,65
<i>M. monoceros</i>	COI	70	780	147	17	0,638	0,0067	5,23	- 2,88*	-1,15*
	Cyt b	50	573	26	15	0,51	0,0031	1,77	-2,32*	-8,139

(N) número de sequencias, (pb) número de pares de bases, (S) sítios polimórficos, (h) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica, (Pi) diversidade nucleotídica, (k) número médio de diferenças nucleotídicas, (D) D de Tajima e (Fs) teste estatístico de Fu. (\*) Indica os valores de D significativos.

Os testes D de Tajima e Fs de Fu para as duas espécies resultaram em valores negativos e significantes para os genes COI e Cyt b. As curvas de distribuição *mismatch*, para ambas as espécies e para os genes COI e Cyt b, apresentaram uma distribuição unimodal. A soma dos desvios dos quadrados (SSD) sugeriu que ambas as espécies passaram por uma recente expansão populacional. A Figura 3 mostra a curva de distribuição *mismatch* para *F. indicus* referente ao gene COI e a Figura 4, a curva de distribuição *mismatch* para *M. monoceros* também para o gene COI. Os valores de Tau ( $\tau$ )

foram 0,665 para *F. indicus* e 0,678 para *M. monoceros*. O período de expansão populacional foi de 10,307 e 28,418 anos passados para *F. indicus* e *M. monoceros*, respectivamente.

Figura 3 - Gráfico da curva de distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) para espécie *F. indicus* e gene COI, indicando os valores da soma dos desvios dos quadrados e o respectivo valor de p.

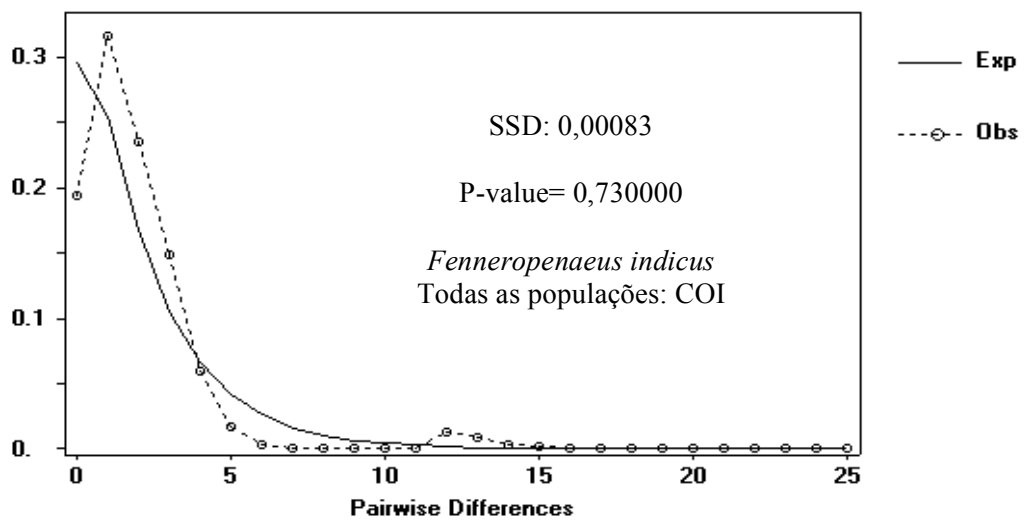
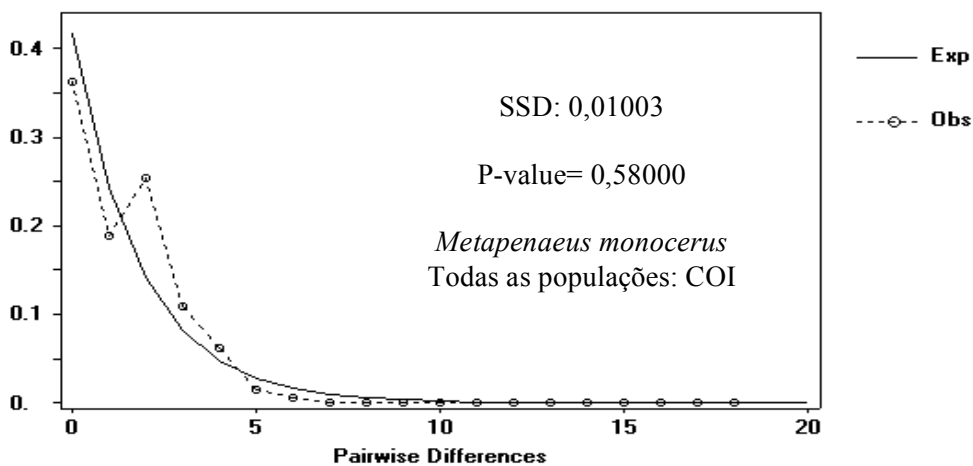


Figura 4 - Gráfico da curva de distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) para espécie *M. monoceros* e gene COI, indicando os valores da soma dos desvios dos quadrados e o respectivo valor de p.



Os valores de  $F_{ST}$  par a par em todos os genes avaliados e para as duas espécies sugerem ausência de estruturação populacional. A Tabela 7 apresenta a matriz dos valores de  $F_{ST}$  usando a distância par a par para a espécie *F. indicus* e gene COI. Os resultados da AMOVA para todos os *loci* mostraram que mais de 99% da variação ocorre dentro das populações. A Tabela 8 apresenta os valores da AMOVA para a espécie *F. indicus* e gene COI. O valor global do  $F_{ST}$  foi 0 ( $p < 0,05$ ) para as duas espécies.

Tabela 7 - Matriz dos valores  $F_{ST}$  usando a distância par a par (diagonal inferior) e os seus valores de P (diagonal superior) para o gene COI na espécie *F. indicus* para o nível de significância de 0,05

População	Angoche	Beira	Maputo	Quelimane
<b>Angoche</b>	*	0.37838+-0.0297	0.82883+-0.0379	0.79279+-0.0298
<b>Beira</b>	0.00322	*	0.76577+-0.0390	0.11712+-0.0273
<b>Maputo</b>	-0.01125	-0.00732	*	0.90991+-0.0214
<b>Quelimane</b>	0.01290	-0.01034	-0.00673	*

Tabela 8 - Resultados da Análise de Variância Molecular para o Gene COI na espécie *F. indicus*.

Grupos	Fonte de Variação	% de variação	Índice de fixação	Valores de P
A	Entre os Grupos	-1.23	$F_{CT}$ -0.01227	1.00000+-0.00000
	Entre pop. dentro Grupos	0.40	$F_{SC}$ 0.00394	0.87195+-0.01058
	Dentro das populações	<b>100.83</b>	$F_{ST}$ -0.00828	0.86901+-0.01306
B	Entre os Grupos	-0.72	$F_{CT}$ -0.00723	0.84262+-0.01171
	Entre pop. dentro Grupos	-0.05	$F_{SC}$ -0.00048	0.92962+-0.00836
	Dentro das		$F_{ST}$	0.87781+-0.01008

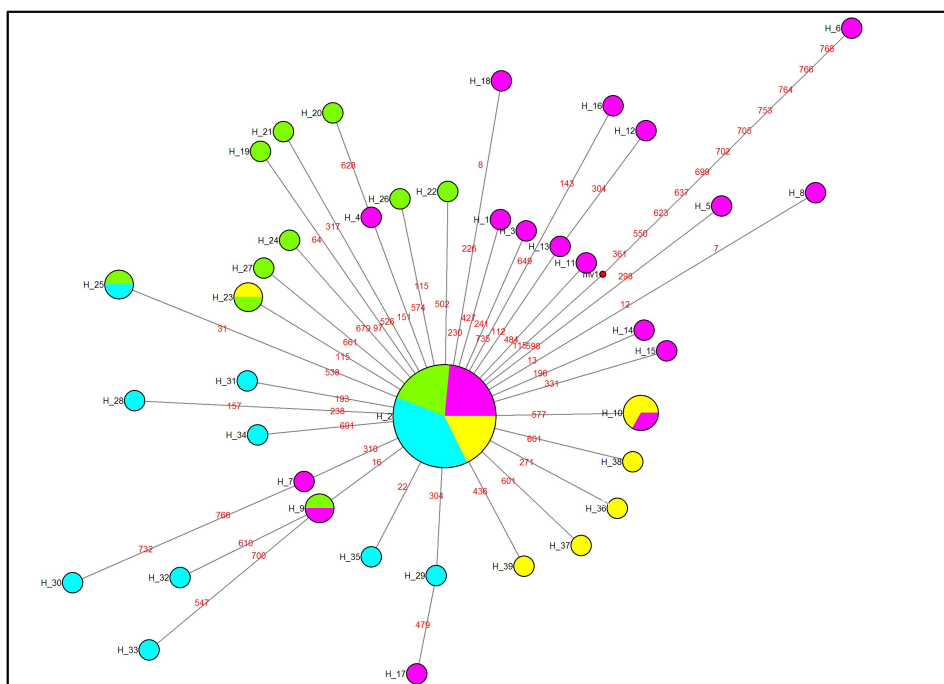
	populações	<b>100.77</b>	-0.00771	
	Entre os Grupos	-0.53	$F_{CT}$	0.67742+-0.01345
	Entre pop. dentro Grupos	-0.14	$F_{SC}$	0.77517+-0.01361
C	Dentro das populações	<b>100.67</b>	$F_{ST}$	0.88074+-0.00806
			-0.00667	

Agrupamentos: (A) (Maputo + Sofala), Angoche e Quelimane, (B) (Maputo + Quelimane), Beira e Angoche, (C) (Maputo + Angoche) e Beira e Quelimane.

O teste de mantel mostrou correlação positiva entre a distância geográfica e a genética para ambas as espécies, mas os valores não foram significativos para os três *loci* analisados. O anexo B mostra os resultados do teste de mantel para a espécie *F. indicus*.

As redes de haplótipos para o gene COI e gene Cyt b apresentaram uma estrutura em forma de estrela, sugerindo mais uma vez que as duas espécies podem ter passado por uma expansão populacional recente (Figuras 5, 6, 7 e 8). A rede de haplótipos referente à região de controle D-loop não apresentou nenhuma forma definida, não sendo informativa (Anexo F e G).

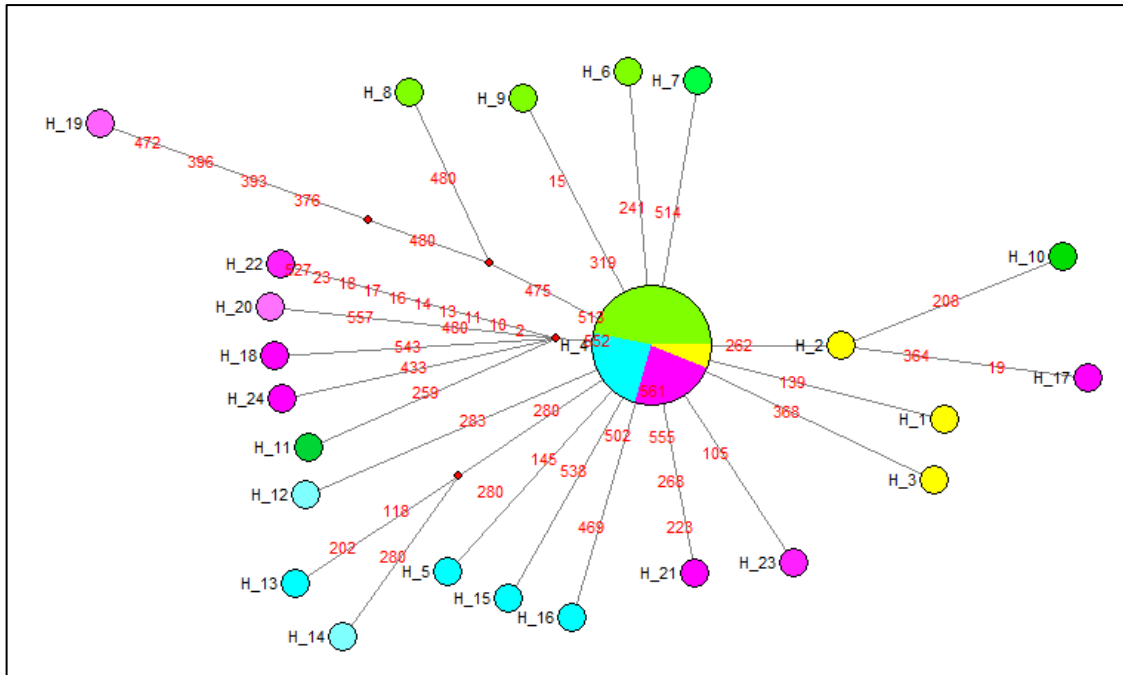
Figura 5 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do COI na espécie *F. indicus*.



As cores representam os diferentes locais de coleta ao longo da costa de Moçambique e encontram-se distribuídas da seguinte forma: amarelo Angoche, azul Quelimane, verde Sofala e rosa Maputo.

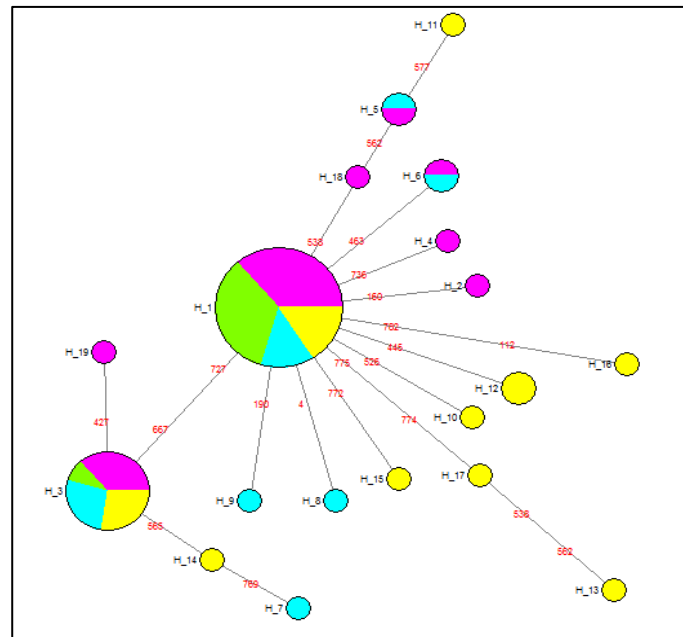


Figura 6 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do Cyt b na espécie *F. indicus*



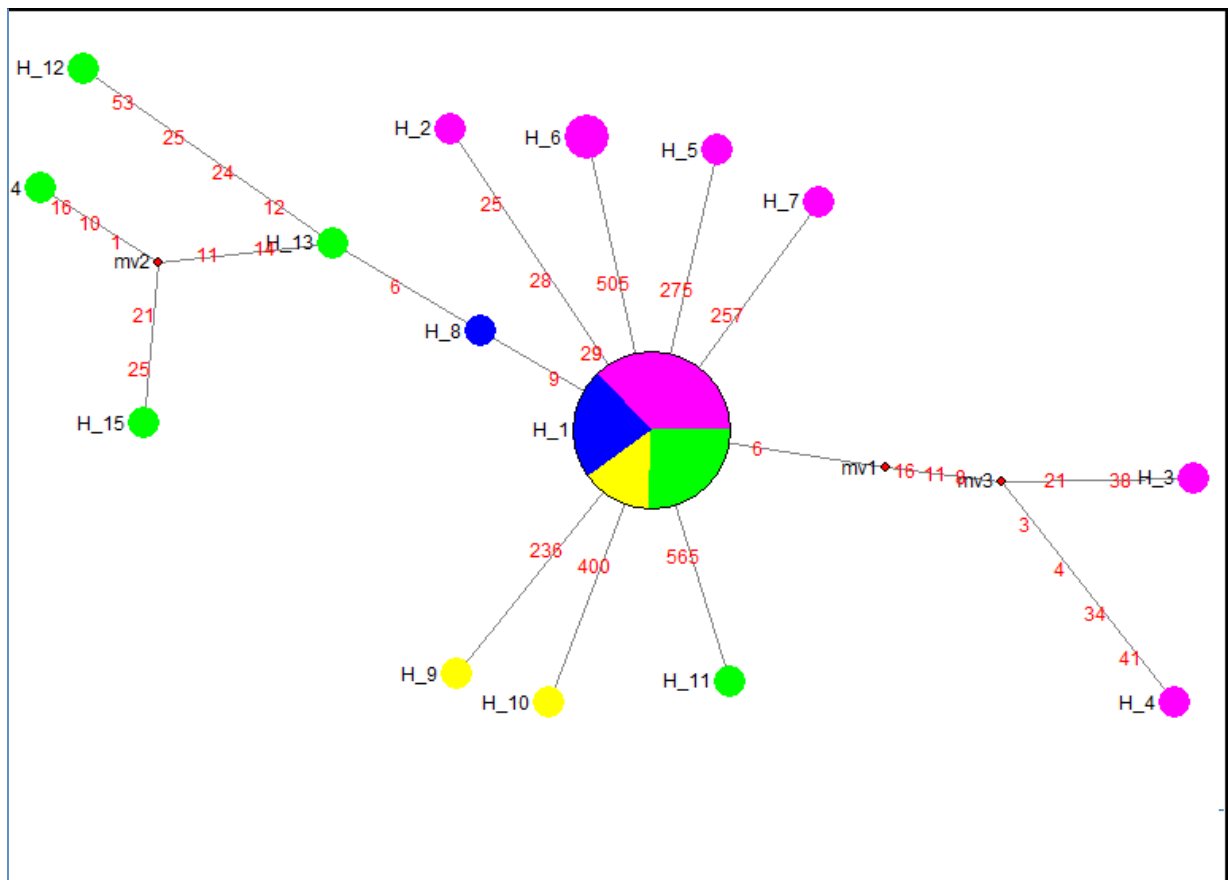
As cores representam os diferentes locais de coleta ao longo da costa de Moçambique e encontram-se distribuídas da seguinte forma: amarelo Angoche, azul Quelimane, verde Sofala e rosa Maputo.

Figura 7 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do COI para a espécie *M. monoceros*



As cores representam os diferentes locais de coleta ao longo da costa de Moçambique e encontram-se distribuídas da seguinte forma: amarelo Angoche, azul Quelimane, verde Sofala e rosa Maputo.

Figura 8 - Rede de haplótipos obtida a partir das sequências do Cyt b para a espécie *M. monoceros*



As cores representam os diferentes locais de coleta ao longo da costa de Moçambique e encontram-se distribuídas da seguinte forma: amarelo Angoche, azul Quelimane, verde Sofala e rosa Maputo.

## 2.4. Discussão

As análises do polimorfismo do DNA mitocondrial têm sido empregadas para avaliar a diferenciação populacional intra e interespecífica, a estrutura e as relações filogenéticas em algumas populações de camarões peneídeos (BENZIE, 2000; LAVERY et al., 2004; DE CROSS; PÁLSSON, 2010). Estudos da diversidade genética e diferenciação geográfica de organismos marinhos são cruciais para o desenvolvimento de programas para uma gestão sustentável (AVISE, 1994). A diversidade nucleotídica combinada com uma alta diversidade haplotípica causada pelas novas mutações tem sido atribuída a uma população que passou por um gargalo genético seguido de uma expansão populacional (AVISE; NEIGEL; ARNOLD, 1984).

O principal achado neste trabalho foi uma alta variação do mtDNA nos *loci* analisados. Apesar dos três marcadores avaliados terem apresentado uma alta diversidade o D-loop foi o que apresentou maiores valores em todos os parâmetros avaliados quando comparado com o gene COI e Cyt b (Tabela 6). Vários estudos com camarões peneídeos têm mostrado que é comum o D-loop apresentar uma diversidade genética elevada (MCMILLEN-JACKSON; Bert, 2004; TZENG, 2007; DUMONT, L.; HWANG; MACLEAN, 2009). KHEDKAR et al. (2013) observaram um alto nível de diversidade genética baseado no D-loop na espécie *P. monodon* da oriental da Índia. Esse resultado não difere dos encontrados no presente estudo. Não é de se surpreender encontrar uma alta diversidade genética no D-loop, uma vez que esta região do mtDNA apresenta elevados níveis de mutação. Além disso, já foi demonstrado que esta região é a mais variável em vertebrados e invertebrados (SIMON, 1991).

MUNASINGHE (2014) usando o Dloop encontrou elevados valores de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica no estudo que conduziu sobre a diversidade genética de *Penaeus monodon* da região oriental e ocidental de Sri Lanka. KHAMNAMTING et al. (2009), baseados no gene COI, analisaram a diversidade genética e a variação geográfica de *P. monodon* da costa tailandesa e encontraram uma alta variabilidade. Os resultados encontrados por estes dois pesquisadores não diferem dos encontrados no presente trabalho em relação ao gene COI. No entanto, a variabilidade genética com base no gene COI apresentou valores inferiores aos encontrados para a região D-loop. Este resultado pode ser justificado pelo fato do gene COI ser um gene mais conservado em relação ao D-loop, porém ele apresenta uma região variável que exibe diversidade suficiente para sua aplicação em análises de populações (DE FRANCISCO; GALETTI, 2005; VASEEHARAN et al., 2013).

Os testes D de Tajima e  $F_s$  de Fu são sensíveis a fatores como gargalo genético, quando os valores de D e  $F_s$  são positivos, e para expansão populacional, quando os valores de D e  $F_s$  são negativos (TAJIMA, 1996). Os testes de neutralidade apresentaram um resultado negativo e significativo para os genes COI e Cyt b em ambas as espécies analisadas, sugerindo uma recente expansão populacional. A curva de distribuição *mismatch*, não apresentou desvios significativos em relação aos valores esperados dos observados, assumindo assim a hipótese nula de uma expansão populacional.

De Cross; Pálsson (2010) estudaram a diversidade genética e a estrutura populacional de *F. indicus* baseados no gene COI, e observaram um padrão unimodal consistente com uma expansão populacional. Em 2011, estes mesmos autores avaliaram a diversidade genética de duas populações de *Parapenaeopsis coromandelica*, em Sri Lanka, obtendo uma curva de distribuição *mismatch* unimodal idêntica à encontrada no presente trabalho. Grande parte dos

trabalhos com peneídeos que se referem a estudos demográficos populacionais (MCMILLEN-JACKSON; BERT, 2004; TZENG, 2007; LI et al., 2009; IMAI et al., 2013) apontam para uma recente expansão populacional que coincide com a era da glaciação. Segundo Dall et al. (1990) os peneídeos não suportam temperaturas abaixo de 15° C. Este fato sugere que os peneídeos de passaram por um período de gargalo genético que possivelmente tenha sido causado pelas baixas temperaturas que existiram nessa época, seguido de uma expansão populacional após a era de glaciação. No entanto no que respeita a *F. indicus* em que a sua expansão de seu a 28,418 esta ocorreu na era interglacial.

Os resultados da AMOVA para os três *loci* analisados demonstraram uma ausência de estruturação genética populacional. Este resultado foi também evidenciado pelas redes de haplótipos que se apresentaram em forma de estrela, típico de uma população em expansão. Estes resultados diferem dos observados por De Croos; Pálsson (2010) cujo trabalho baseado no gene COI resultou numa ligeira diferenciação da espécie *F. indicus* a partir de distancias de 130 km. Os mesmos autores em 2011, baseados no COI, observaram uma estruturação entre duas populações de *Parapenaeopsis coromandelica* existentes em duas regiões vizinhas em Sri Lanka. Segundo estes autores a diferenciação por eles encontrada se deveu a uma grande intensidade de pesca. No caso das espécies de Moçambique, embora estejam a passar por ameaças devido à presença de duas espécies exóticas (Simbine, 2015 dados não publicados) de camarão e à super-exploração (Ministério das Pescas da República de Moçambique, 2012), ainda não apresentam evidência genética de diferenciação populacional, possivelmente devido aos períodos de defeso estipulados com vista a uma gestão sustentável.

Um estudo feito por MKARE (2013) para avaliar a diversidade genética das espécies *F. indicus*, *M. monoceros* e *P. monodon* oriundas da costa queniana, baseado no D-loop e microsatélites, resultou na ausência de diferenciação populacional de todas as espécies analisadas. Não é de surpreender o achado deste autor, uma vez que a costa queniana, tal como a costa de Moçambique, estão próximas uma da outra e partilham o oceano Índico. Ambas não apresentam barreiras físicas que possam impedir o fluxo gênico das populações de camarão habitantes nesta área.

A falta de estruturação das populações das espécies avaliadas pode ser resultante da natureza das correntes marinhas que se observam no Canal de Moçambique. Este é caracterizado por um ambiente dinâmico, com fortes fenômenos de mesoescala, incluindo redemoinhos ciclônicos e anticiclônicos que influenciam todos os componentes biológicos dos ecossistemas pelágicos (TERNON et al., 2014; LAMONT et al., 2014). Sua forma geográfica particular e localização tornam o Canal de Moçambique muito específico em termos de

circulação oceânica e é considerada uma das áreas mais turbulentas no mundo (TERNON et al., 2014). Estes fenômenos são agravados pela ausência de barreiras geográficas (MKARE, 2013) que poderiam impedir a dispersão dos camarões de uma região para outra resultando em estruturação.

As populações das espécies *F. indicus* e *M. monoceros* não apresentaram estruturação genética, possuem uma alta variabilidade genética, podendo ser utilizadas inclusive para aquicultura. Ambas as espécies passaram por uma recente expansão populacional.

O trabalho mostrou que os camarões *F. indicus* e *M. monoceros*, do ponto de vista da conservação apresentam um único banco genético ao longo da costa de Moçambique, contradizendo a hipótese de ocorrência da estruturação genética para essas espécies. No entanto, seria interessante fazer um estudo complementar utilizando marcadores de mutação rápida como, por exemplo, os microssatélites e /ou SNPs. Com estes marcadores pode ser que se consiga encontrar alguma diferenciação mais recente destas espécies



## CAPÍTULO II

### 3. USO DO DNA BARCODING NA IDENTIFICAÇÃO DOS CAMARÕES PENEÍDEOS DE IMPORTÂNCIA COMERCIAL DA COSTA DE MOÇAMBIQUE

#### Resumo

O DNA Barcoding é considerado uma excelente ferramenta para identificação rápida de espécies. Neste trabalho, o DNA Barcoding foi utilizado sequenciando o gene Citocromo Oxidase c subunidade I para identificar nove espécies nominais de peneídeos da costa moçambicana. Um total de 69 amostras foi coletado na Baía de Maputo. A árvore de distância genética agrupou as espécies, no entanto, seis espécies apresentaram dois clados com relação ao lugar de origem, sugerindo a presença de duas linhagens. A distância genética intraespecífica variou de 0 a 8,636 e a distância interespecífica variou de 3,897 a 21,558. A análise da distribuição de distância para o vizinho mais próximo variou de 3,897 a 18,971. Pela primeira vez foi feita a identificação molecular com base no DNA Barcoding de camarões da costa de Moçambique. Esta se mostrou eficiente na identificação das espécies dos peneídeos desta costa e foram encontradas duas linhagens em seis espécies que possivelmente são espécies crípticas.

**Palavras-chave:** Penaeidae, taxonomia, COI, análise molecular, Barcode gap, mtDNA

#### Abstract

DNA Barcoding is considered an excellent tool for rapid species identification. In this work, DNA barcoding was used sequencing the Cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) to identify nine nominal penaeids species from the Mozambican coast. A total of 69 samples were collected from Maputo Bay in Mozambique coast. The neighbour-joining (NJ) distance grouped correctly almost all species, nevertheless six species presented two clades in relation to the origin place, suggesting the presence of different lineages. The intraspecific distance ranged from (0, 0 to 8,636) and the interspecific distance varied from (3.897 to 21.558). The comparison of Nearest Neighbour distribution distance ranged from (3, 897 to 18.971). This study comprises the first molecular DNA Barconding performed in Mozambican shrimp using

COI, which was efficient in identifying penaeid species from this coast and there was found two different lineages with are possible cryptic species.

**Keywords:** Penaeidae, DNA barcoding, COI, Cryptic Species, mtDNA

### 3.1. Introdução

A identificação acurada de espécies é uma atividade importante que deve ser usada para uma gestão sustentada assim como monitoramento das populações, sobretudo as de grande valor economico (WARD, 2000; BEERKIRCHER et al., 2009).

A diversidade dos seres vivos é um dos aspectos mais marcantes do globo terrestre. Estimativas recentes indicam a existência de cerca de 8,7 milhões de espécies no mundo, das quais 2,2 são espécies marinhas e as restantes terrestres (MORA et al., 2011). Segundo estes autores, cerca de 90% das espécies terrestres e 91% das espécies oceânicas ainda não foram descritas. Para responder a esta grande lacuna, faz-se necessário um grande esforço por parte da comunidade científica. No entanto, a identificação de espécies não é uma tarefa fácil, pois exige pessoal especializado. Dentro da rotina da classificação taxonômica, são conhecidas quatro principais limitações: 1) Erros de identificação que podem surgir devido à plasticidade fenotípica assim como a variabilidade genética dos caracteres que são empregados para o reconhecimento de espécies; 2) A presença de espécies morfologicamente crípticas pode conduzir a erros de identificação; 3) muitas vezes as chaves morfológicas são eficientes somente para um estágio do ciclo de vida dificultando a identificação de muitos indivíduos; 4) o uso de chaves de identificação requer um especialista para não comprometer o trabalho. Segundo Seberg (2004), seriam necessários cerca de 940 anos para descrever as espécies existentes no mundo. A escassez de taxonomistas para os vários grupos de organismos no mundo conduziram a necessidade de se criar uma nova abordagem de identificação dos organismos. Neste contexto, Hebert et al. (2003) propuseram o uso de um pequeno fragmento do gene mitocondrial COI, como uma ferramenta confiável, de análise relativamente rápida e de baixo custo para identificação das espécies pertencentes ao reino animal, o chamado DNA barcoding ou “código de barras do DNA”. Esta técnica consiste no uso de um pequeno fragmento do mtDNA, a subunidade c do Citocromo oxidase I (COI) como uma região padrão para identificar espécies. Sequências do DNA de espécies desconhecidas podem ser comparadas com outras existentes numa base de dados “Bold system” para sua identificação



(HEBERT et al., 2003). Apesar da grande utilidade e eficiência que o DNA barcoding apresenta na identificação de espécies, alguns problemas podem ser encontrados principalmente quando se usa primers universais. Um exemplo disso é a presença de pseudogenes que são cópias não funcionais do mtDNA no núcleo, que têm sido encontradas em grande clados de organismos eucarióticos. Estes podem ser coamplificados com o mtDNA conduzindo a um erro na análise (SONG et al., 2008; BUHAY, 2009).

O DNA barcoding é considerado uma excelente ferramenta para diferenciar espécies dentro de um grupo quando a variação interespecífica é maior que a intraespecífica, sendo essa diferença comumente chamada de *barcode gap* (WIEMERS; FIELLDER, 2007). O primeiro trabalho que testou a aplicabilidade do método do DNA barcoding com base no gene COI para a identificação de crustáceos foi desenvolvido por COSTA et al. (2007), onde verificaram a eficiência desta ferramenta. Porém, ressaltaram a necessidade de se depositarem sequências no Bold System, pertencentes às 849 famílias de crustáceos, para a parametrização do perfil ordinal do Subfilo (COSTA et al., 2007). Tendo em conta o grande número de famílias existentes de crustáceos, são relativamente poucos os trabalhos usando o DNA barcoding na identificação destas famílias (LEFÉBURE et al., 2006; COSTA et al., 2007; KUMAR et al., 2012).

No grupo dos camarões Peneídeos existe um grande número de espécies comercialmente importantes que habita maioritariamente regiões tropicais e subtropicais em águas costeiras e rasas (DALL et al., 1990; CHAN, 1998). Ao longo da costa leste africana, partindo do rio Rovuma situado na região norte de Moçambique ao rio Kei situado na África do Sul, foram identificados nove gêneros desta família. A maioria encontra-se na plataforma continental em profundidades que variam de 5 a 70 m. Devido ao seu habitat, eles são vulneráveis à pesca de arrasto. Deste modo fazem parte das espécies comerciais mais importantes (FORBES; DEMETRIADES, 2005). Em Moçambique, os camarões peneídeos são muito importantes para sua economia e dentre as cerca de 20 espécies existentes no país (FISHER et al., 1990), as mais frequentes são: *Penaeus monodon* (camarão tigre gigante), *Melicertus latisulcatus* (camarão real), *Metapenaeus monoceros* (camarão castanho), *Marsupenaeus japonicus* (camarão flor), *Fenneropenaeus indicus* (camarão branco) e *Penaeus semisulcatus* (camarão tigre). Dentre estas, as espécies *F. indicus* e *M. monoceros* são as mais abundantes e, por conseguinte as mais importantes economicamente.

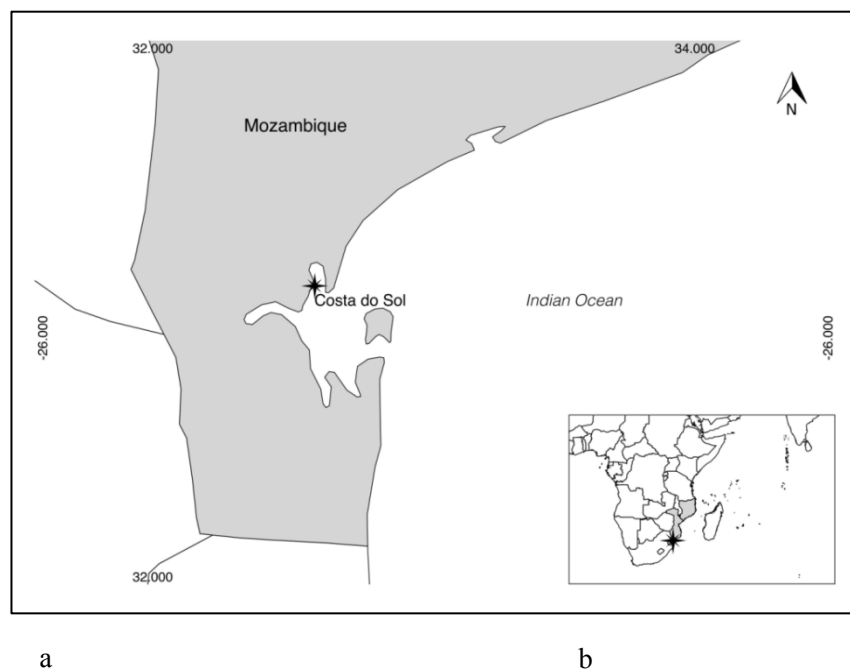
Recentemente tem sido registrada a presença de duas espécies de camarão não antes observadas na costa Moçambicana, cuja identificação não foi realizada até o momento. Este fato tem provocado grande insatisfação por parte da comunidade, uma vez que uma delas (a

primeira) apresenta tamanhos reduzidos em relação às espécies nativas de interesse comercial, embora a segunda apresente tamanhos aceitáveis quando comparada com as espécies nativas, esta, por ser pouco conhecida dentro da comunidade local, tem tido pouca aceitação comercial. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies nativas de importância comercial em Moçambique incluindo as duas espécies exóticas, usando a ferramenta DNA barcoding que se baseia no gene citocromo c oxidase subunidade I (COI).

### 3.2. Material e Métodos

Um total de 69 amostras foram colectadas ao longo da Baía de Maputo (Figura 9 a e b), no período de julho de 2010, abril a junho de 2011 e junho de 2012, sendo distribuídas pelas seguintes espécies: *Metapenaeus monoceros* (n=10), *Fenneropenaeus indicus* (n=12), *Penaeus monodon* (n=6), *Penaeus semisulcatus* (n=9), *Melicertus latisulcatus* (n=6), *Marsupenaeus japonicus* (n=6), *Metapenaeus stebbingi* (n=7), primeira espécie exótica (n=7) e segunda espécie exótica (n=7).

Figura 9 – Mapa da baía de Maputo e de Moçambique



(a) Baía de Maputo. O ponto indicado no mapa se refere ao local de amostragem (S) 26° 11' 30'' (E) 32° 45' 30''; (b) Moçambique.

Nas duas espécies exóticas a análise morfológica foi realizada por dois grupos de taxonomistas de diferentes instituições, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, RJ, Brasil), e do Central Institute of Marine Fisheries Research (Kerala, Kochi-India). Para a análise morfológica (DALL et al., 1990; PEREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997; SUDHAKARA; RADHAKRISHNAN; JOSE, 2013) foram utilizados cinco indivíduos (macho e fêmea) de cada espécie, e fez-se uma comparação entre os camarões da Índia e Moçambique. Vouchers foram depositados na coleção crustáceos do Laboratório de Genética Pesqueira e da Conservação (LGPESC, UERJ, RJ, Brasil), sob os números (LGP1503, LGP 1504 e LGP1505). As demais espécies foram analisadas morfológicamente na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Um pedaço de tecido muscular (aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>) foi extraído e imediatamente conservado em etanol a 95%, mantido a uma temperatura de 4° C até a extração do DNA. Esta foi conduzida usando-se o método descrito por Sambrook; Fritsh (1989). Os primers foram descritos por Marques et al., (in prep). Um segmento de 598 pb do citocromo c oxidase subunidade I (COI), foi amplificado nas seguintes condições: Para um volume final de 30 µl, adicionou-se 3 µl de Buffer a 10 X, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, 2,4 µl de dNTP a 2,5 mM, 0,9 µl de cada primer (*forward e reverse*) a 10 pmol, 1 unidade de Taq DNA *Platinum* (Invitrogen) e 3 µl de DNA a 50 ng/µl. A amplificação foi levada a cabo no termociclador (Applied Biosystems; veriti™ 96 well) com o seguinte protocolo: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 55 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos de 72°C por 30 minutos de extensão final.

Para testar a qualidade da amplificação, correu-se um gel de agarose a 1% em TBE a 1X durante 50 minutos a 100 volts e 300mA. O gel foi depois corado com gel red para visualização do fragmento amplificado. A purificação foi levada a cabo segundo o protocolo de polietilenoglicol-PEG8000 (LIS, 1980). Os fragmentos foram sequenciados na Macrogen Inc. com os mesmos primers usados na amplificação.

Para a identificação das espécies de peneídeos de Moçambique, foram baixadas 30 sequências do GenBank de camarões peneídeos pertencentes ao gene COI, tendo o cuidado de verificar a origem dos espécimes coletados (Anexo A). Estas sequências foram usadas para comparar com os camarões de Moçambique.

As sequências nucleotídicas foram alinhadas usando o programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBRON, 1994), implementado no programa Geneious R6 (KEARSE et al., 2012). Estas foram então submetidas ao programa MEGA 4.0 para a construção da árvore Neighbour-joining (NJ) com o suporte de 1500 réplicas de bootstrap e

nela observar os agrupamentos das sequências. Para todos os cálculos da distância genética foi usado o modelo K2P (TAMURA et al., 2007), este modelo é o padrão na literatura para análise das sequências barcode.

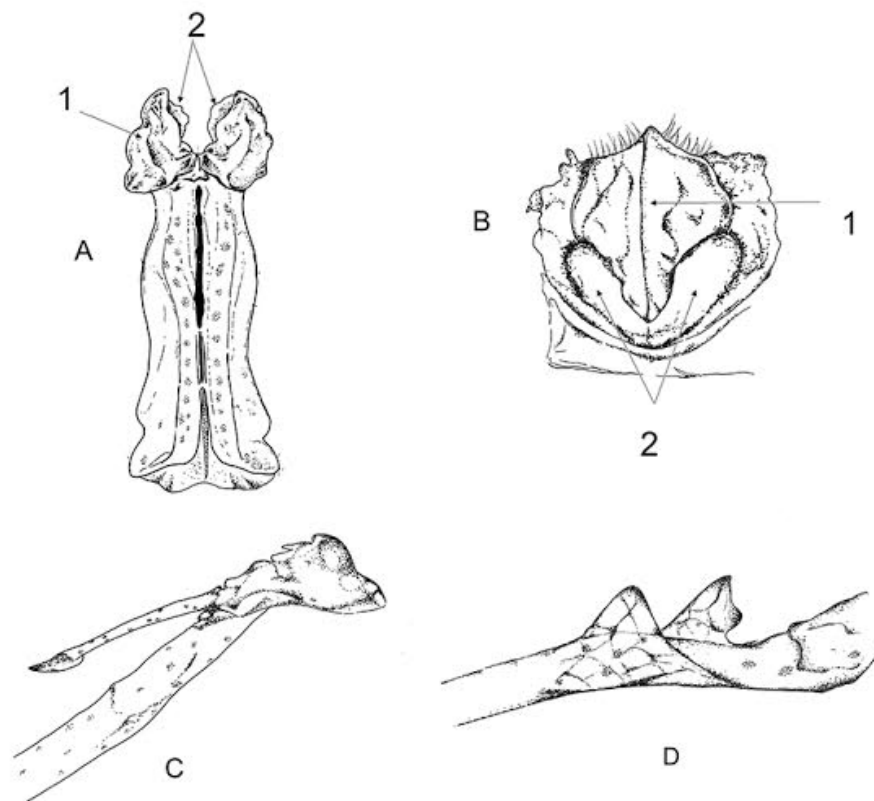
Foram calculadas as distâncias máximas, médias e mínimas interespecífica e intraespecífica. Estes cálculos foram efetuados num programa ainda não publicado, escrito na linguagem Python por J. Ramirez. Um cálculo adicional das distâncias máxima, média e mínima interespecífica e intraespecífica com a mesma ferramenta anteriormente usada foi efetuado separando as espécies em linhagens, com base no resultado observado da árvore de distância genética (NJ). Foram comparados os valores da distância média e máxima intraespecífica com os valores da distância do vizinho próximo para cada espécie. Para confirmar a existência e a magnitude do código do *Barcode Gap*, foram construídos gráficos de dispersão dos dados.

### 3.3. Resultados

A análise morfológica apontou um total de nove espécies oriundas da costa de Moçambique, das quais sete são espécies nativas e duas possivelmente exóticas. As duas exóticas foram identificadas como *Metapenaeus dobsoni* (sendo esta a primeira espécie) e *Mierspenaeopsis scuptilis* (a segunda espécie). *M. dobsoni*, uma espécie originalmente distribuída na região do Indo-Pacífico ao longo da costa da Índia, Sri Lanka, Malásia, Indonésia, Filipinas e na Nova Guiné (SUDHAKARA; RADHAKRISHNAN; JOSE, 2013)

É caracterizada pela presença de um longo rostro armado com oito a nove espinhos na face dorsal, com uma curva dupla bem marcada, exopodite ausente na quinta pata do tórax, sulco branquiocárdico atingindo quase até o meio da carapaça, “pleurobranch” no sétimo somito torácico, telson armado apenas com espículas, sem cerdas robustas no periópode. Os machos adultos foram caracterizados por ter o petasma armado com projeções disto-medianas e disto-laterais [Figura 10A (1, 2)], com um filamento ventral curto e outro filamento na superfície dorsal do petasma. Um espinho basal no terceiro periópode (Figura 10C) e presença de merus no quinto periópode com um a dois espinhos largos triangulares (F 10D). Presença de tético nas fêmeas (Figura 10B) com um sulco longo dorsal [(Figura 10B (1)] sem bainhas lembrando uma ferradura formada por duas placas laterais (Figura B2).

Figura 10 – Estruturas morfológicas da genitália masculina e feminina, espinho basal e periópode de *M. dobsoni*



(A, B) Genitália masculina e feminina. (A) Petasma (vista ventral) que mostra a projeção disto- lateral (A1) e projeção disto-mediana (A2). (B) Télico mostrando um sulco longo (B1) e placas laterais (B2). Espinho basal da terceira perna (macho) (C), merus no quinto periópode com um ou dois espinhos triangulares grandes (D).

A cor do corpo apresentou-se transparente com manchas vermelhas ou esverdeadas, mais escura na parte distal da rostró, antenulas e antenas pontilhadas vermelho, periópodes e pleópodos de cor branca até rosa, urópodes vermelhos, dupla fila de manchas avermelhadas no telson com uma margem esverdeada.

*M. sculptilis* (Figura 11), uma espécie que ocorre naturalmente em Bangladesh, Índia, Malásia, Filipinas, Taiwan, Papua Nova Guiné, Indonésia, Brunei, Paquistão, Austrália e Hong Kong. Apresentou as seguintes características morfológicas: Nos machos o rostró

apresentou-se armado com sete a nove dentes dorsais, em forma de sigmóidal, sem dentes na terceira metade distal, com a porção desarmada curvada para cima. Crista posrostral quase atingindo a margem posterior da carapaça, ligeiramente sulcada ou achatada; espinhos basais presentes no primeiro e segundo periópode; telson desarmado; petasma longo, em forma orelha de coelho com projeções disto-mediana, profundamente côncavo na parte ventral; projeções disto-lateral curtas, dirigidas antero-lateralmente: télico com placa anterior arredondada articulando com placa posterior, este último com um tubérculo mediano com cerdas longas; corpo marrom escuro e quase preto com bandas transversais; carapaça dorsal marrom escuro, com uma faixa branca no meio, lateralmente muito mais claro, amarelo ou alaranjado; com bandas no abdômen atingindo margem ventro- lateral; periópodes amarelados a rosados; pleópodos cor de rosa a vermelho escuro; urópodes amarelo e rosa, com uma faixa ampla no meio, marrom escuro transversalmente (SUDHAKARA; RADHAKRISHNAN; JOSE, 2013).

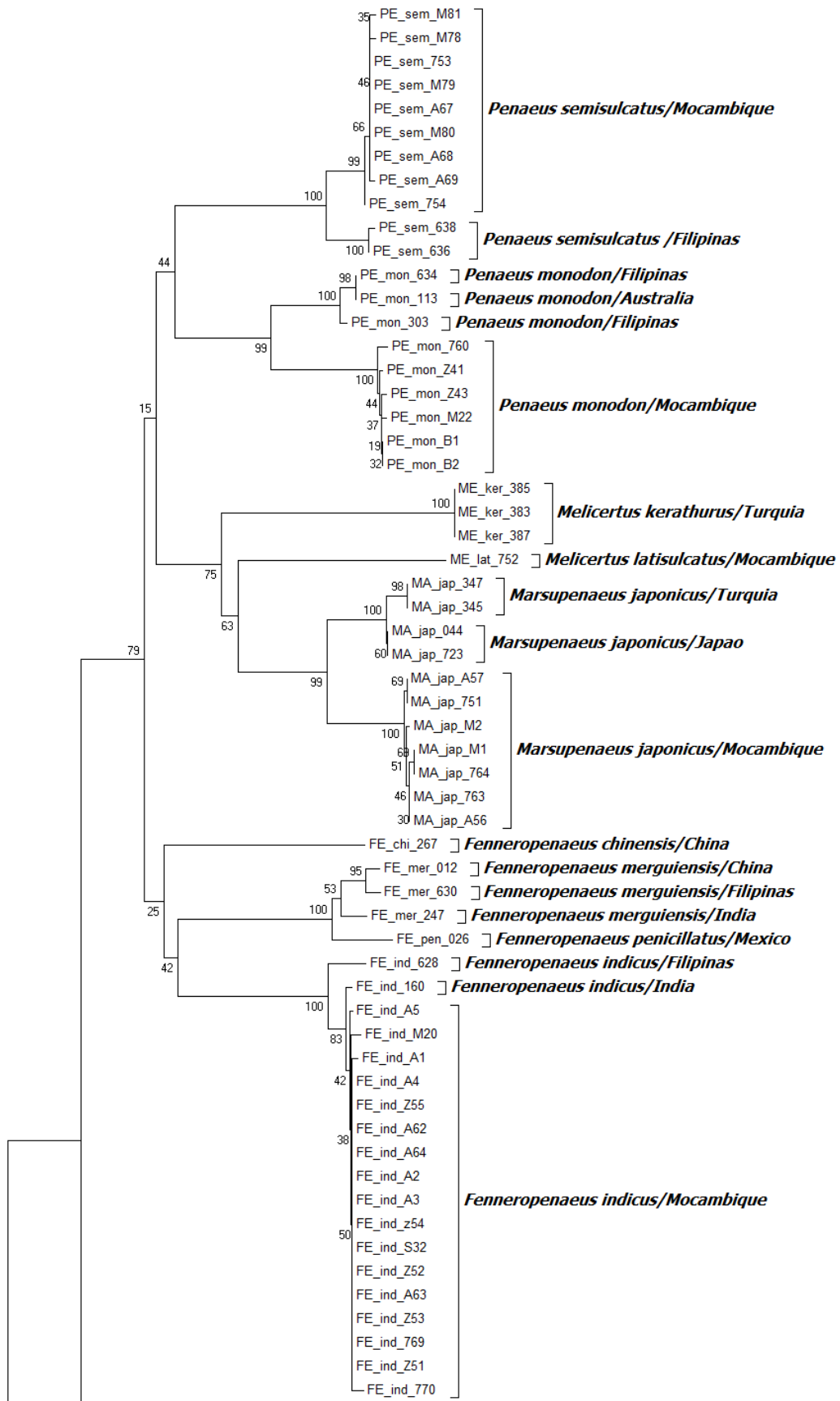
Figura 11 - Imagem lateral de *Mierspanaeopsis sculptilis* (HELLER,1862) coletada e fotografada em 2013 na Bahia de Maputo em Moçambique, durante o monitoramento da espécie



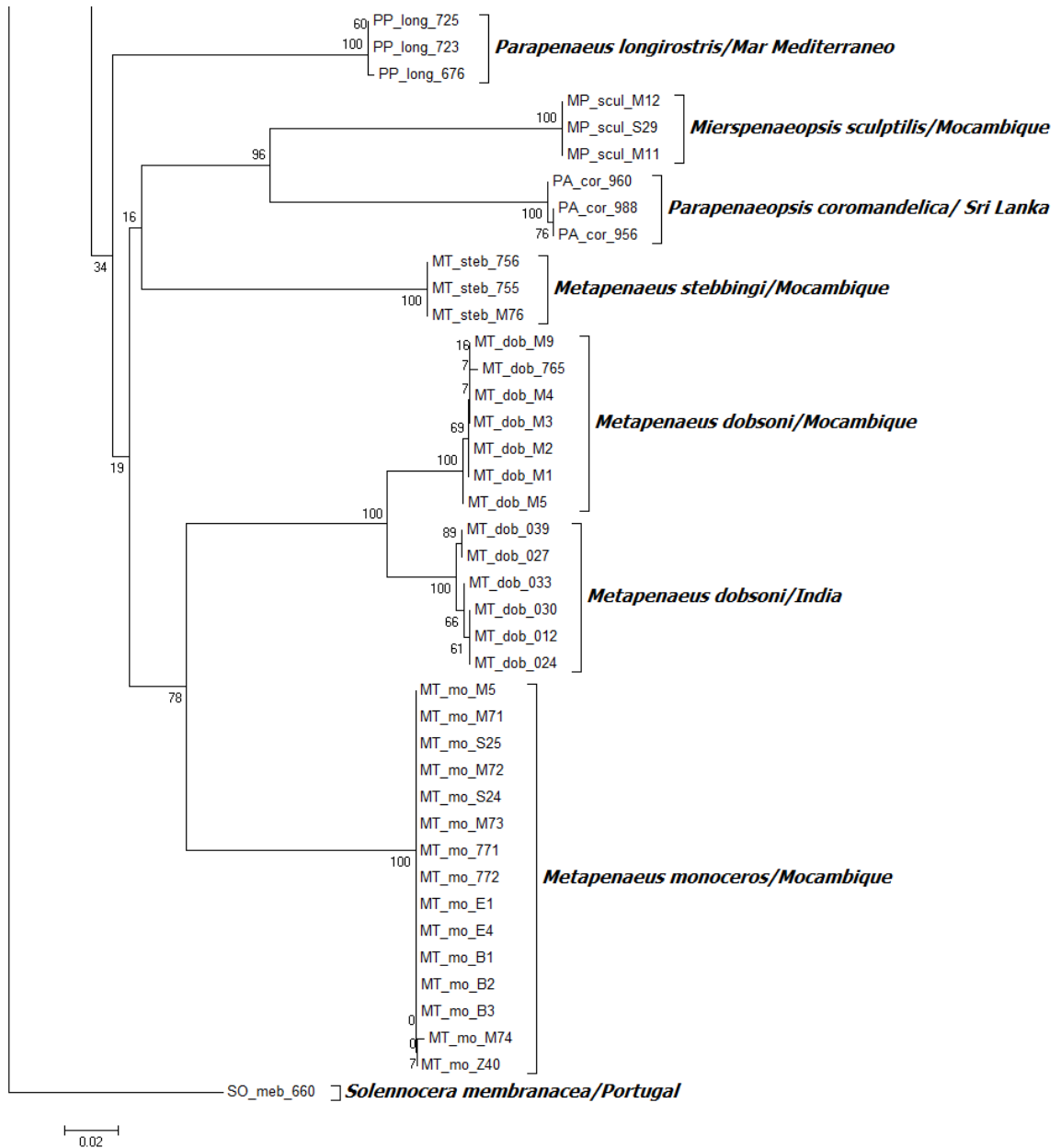
Foram geradas 69 sequências barcode (COI) e depositadas na base de dados do Bold Systems ([www.barcodinglife.com](http://www.barcodinglife.com); Anexos C, H, I, J, K e L). Não foram observados pseudogenes nem *stop codon* (codons de parada) nas sequências. A árvore de distância genética agrupou as espécies de forma correta. No entanto, seis espécies apresentaram dois clados com relação ao lugar de origem. Desta forma, os indivíduos de Moçambique ficaram agrupados em um clado e os indivíduos cujas sequências foram obtidas do GenBank em outro clado (Figura 12). Por exemplo, *M. japonicus* apresentou dois clados, um formado por indivíduos de Moçambique e outro com uma ligeira diferenciação entre indivíduos da Turquia e do Japão. Outro exemplo se verificou com *Penaeus monodon*, que também apresenta dois

clados, um com indivíduos oriundos de Moçambique e outro com indivíduos das Filipinas e Austrália. O clado *P. semisulcatus*, apresentou dois grupos, um de Moçambique e outro de Filipinas. O clado *M. dobsoni* apresentou dois grupos, um dos indivíduos de Moçambique e outro de indivíduos da Índia. O clado de *F. merguiensis* também foi dividido por dois grupos de indivíduos da Índia e das Filipinas. E, finalmente o clado da espécie *F. indicus* mostrou dois grupos formados por indivíduos das Filipinas e de Moçambique. As demais espécies apresentaram um clado.

Figura 12 - Árvore da distância genética mostrando a divisão nos clados pertencentes às espécies *M. japonicus*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *F. merguiensis*, *F. indicus*, e *M. dobsoni*







Na análise nominal, onde foram consideradas as espécies sem a divisão em linhagens, a distância mínima intraespecífica foi de 0, a média de 1,209 e a máxima de 8,636. A distância mínima interespecífica foi de 3,897, a média de 17,07 e a máxima de 21,558 (Tabela 9). A distância para o vizinho mais próximo (nearest – neighbour distance -NND) (Tabela 10), ou seja, análise da distância genética mínima entre espécies e seus parentes mais próximos, apresentou valores variando de 3,897 entre *F. merguiensis* e *F. penicillatus* a 18,971 entre *P. coromandelica* e *M. sculptilis* (Tabela 10).

Tabela 9 - Distância mínima, média e máxima intraespecífica e distância mínima, média e máxima interespecífica, dados nominais.

	<b>Mínima</b>	<b>Média</b>	<b>Máxima</b>
intra	0	1,209	8,636
	mínima	média	máxima
inter	3,897	17,068	21,558

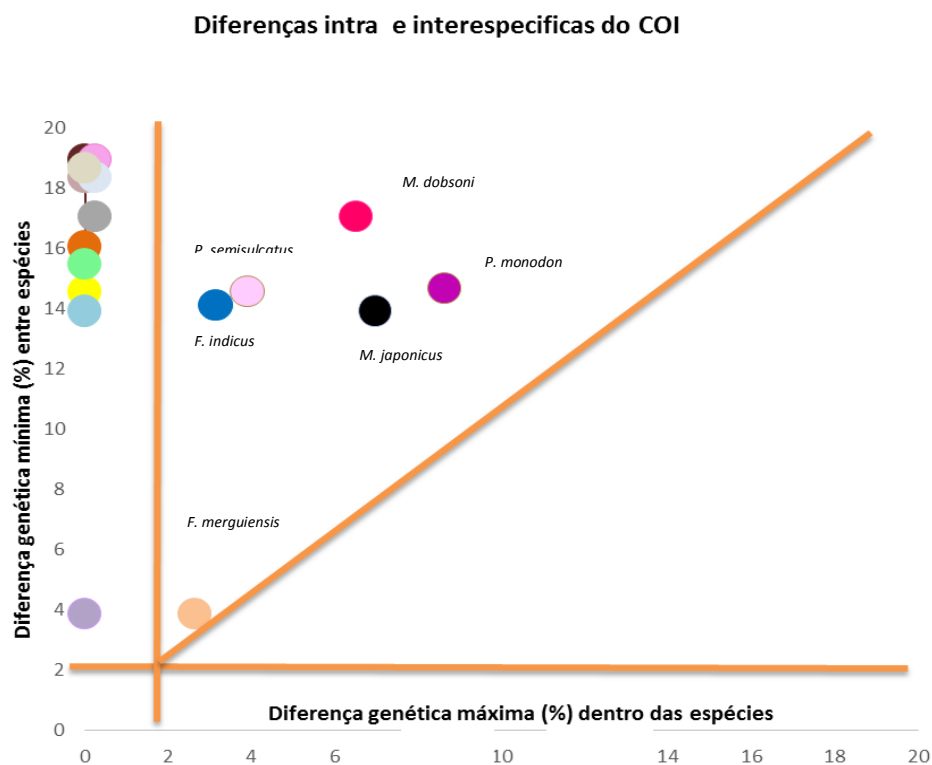
Tabela 10 - Comparação da distribuição de distância para o vizinho mais próximo (NN), dados nominais.

<b>Espécie</b>	<b>Média intra</b>	<b>Máxima intra</b>	<b>NN</b>	<b>Distância NN</b>
FE_chi	0,000	0	PE_sem_754	14,581
FE_ind	0,424	3,143	FE_mer_247	14,111
FE_mer	2,647	2,647	FE_pen_026	3,897
FE_pen	-	-	FE_mer_630	3,897
LI_van	-	-	PE_sem_636	16,064
MA_jap	3,426	6,962	ME_lat_752	13,926
ME_ker	0,000	0	MA_jap_345	15,495
ME_lat			MA_jap_751	13,926
MP_scul	0,000	0	PA_cor_956	18,971
MT_dob	3,289	6,51	MT_mo_771	17,052
MT_mo	0,031	0,236	MT_dob_012	17,052
MT_steb	0,000	0	PP_long_676	18,362
PA_cor	0,157	0,236	MP_scul_M11	18,971
PE_mon	4,257	8,636	PE_sem_636	14,668
PE_sem	1,332	3,905	FE_chi_267	14,581
PP_long	0,157	0,236	MT_steb_755	18,362
SO_meb			PP_long_676	18,673

Considerando o nível nominal das espécies, a figura 13 apresentou a maior parte destas no I quadrante (concordante com a corrente taxonomia: Distância intraespecífica < 2,0 %;

Distância interespecífica  $>$  que 2,0%) (HEBERT et al., 2004). Na mesma figura foram observadas espécies crípticas no II quadrante (estas são candidatas à separação taxonômica). Não foram observadas espécies com hibridação ou com possível sinonímia (III quadrante), nem erros de identificação (IV quadrante) (HEBERT et al., 2004).

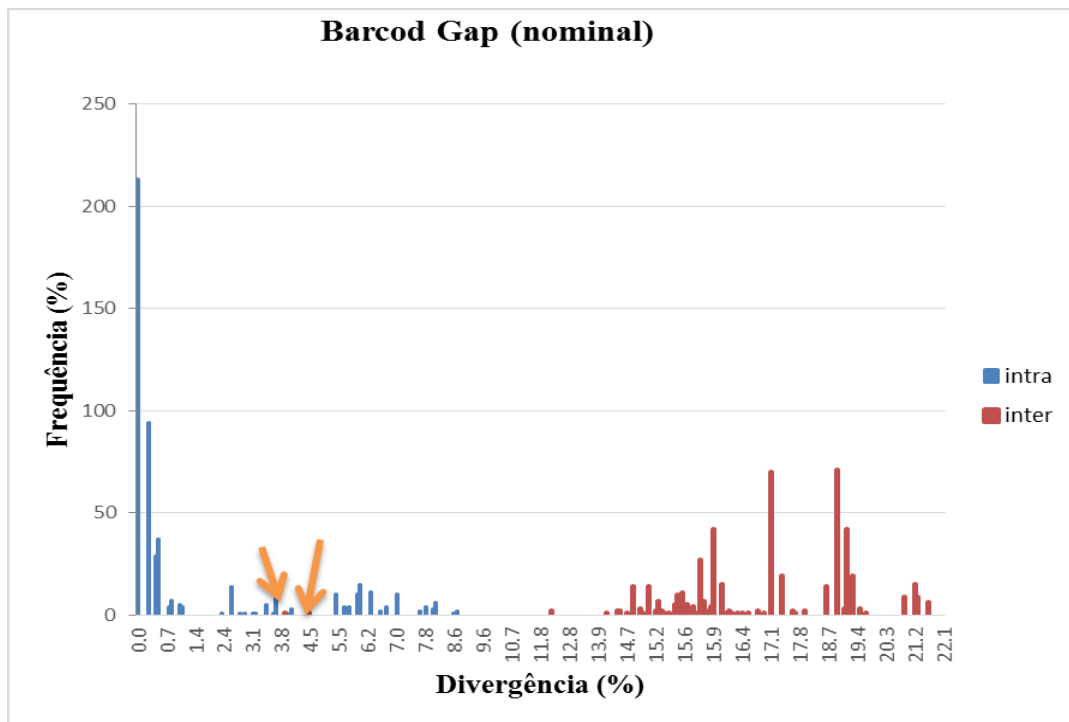
Figura 13 - Gráfico de quadrantes considerando dados nominais considerando um limiar de distância intraespecífica  $<$  2.0%; Distância interespecífica  $>$  que 2.0%



Nele pode se observar seis espécies no II quadrante que podem ser crípticas. No primeiro quadrante encontram-se as seguintes espécies: *F. penisilatus*; *M. latusulcatus*; *F. chinensis*; *M. kerathurus*; *L. vannamei*; *M. monoceros*; *P. longirostris*; *M. stebbingi*; *S. membranacea*; *P. coromadelica* e *M. sculptilis*.

A figura 14 mostra a não existência do *Barcode gap*, uma vez que os valores da distância intraespecífica e interespecífica se sobrepõem. Mesmo tendo as espécies fora do limiar, as distâncias interespecíficas são sempre maiores que as intraespecíficas. Deste modo, o DNA Barcode mostrou ser uma ferramenta eficiente para identificação das espécies analisadas neste trabalho.

Figura 14 - Gráfico Barcode gap mostrando os valores da distância máxima intraespecífica e mínima interespecífica considerando a análise nominal



Neste gráfico pode se observar a ausência do barcode gap provocada pela sobreposição das distâncias intra e interespecíficas indicada pelas setas.

Separando as seis espécies (*M. japonicus*, *F. indicus*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *F. merguensis* e *M. dobsoni*) que se apresentaram em dois clados na árvore de distância genética (NJ), a distância mínima intraespecífica passou a ser de 0, a média foi 0,21 e a máxima de 0,948. A distância mínima interespecífica foi de 2,4, a média 13,78 e a máxima 21,558 (Tabela 11). Na comparação com as sequências do vizinho mais próximo, os valores observados variaram de 2,4 a 18,971 (Tabela 12).

Tabela 11 - Distância mínima, média e máxima intraespecífica e distância mínima, média e máxima interespecífica, (espécies separadas em linhagens)

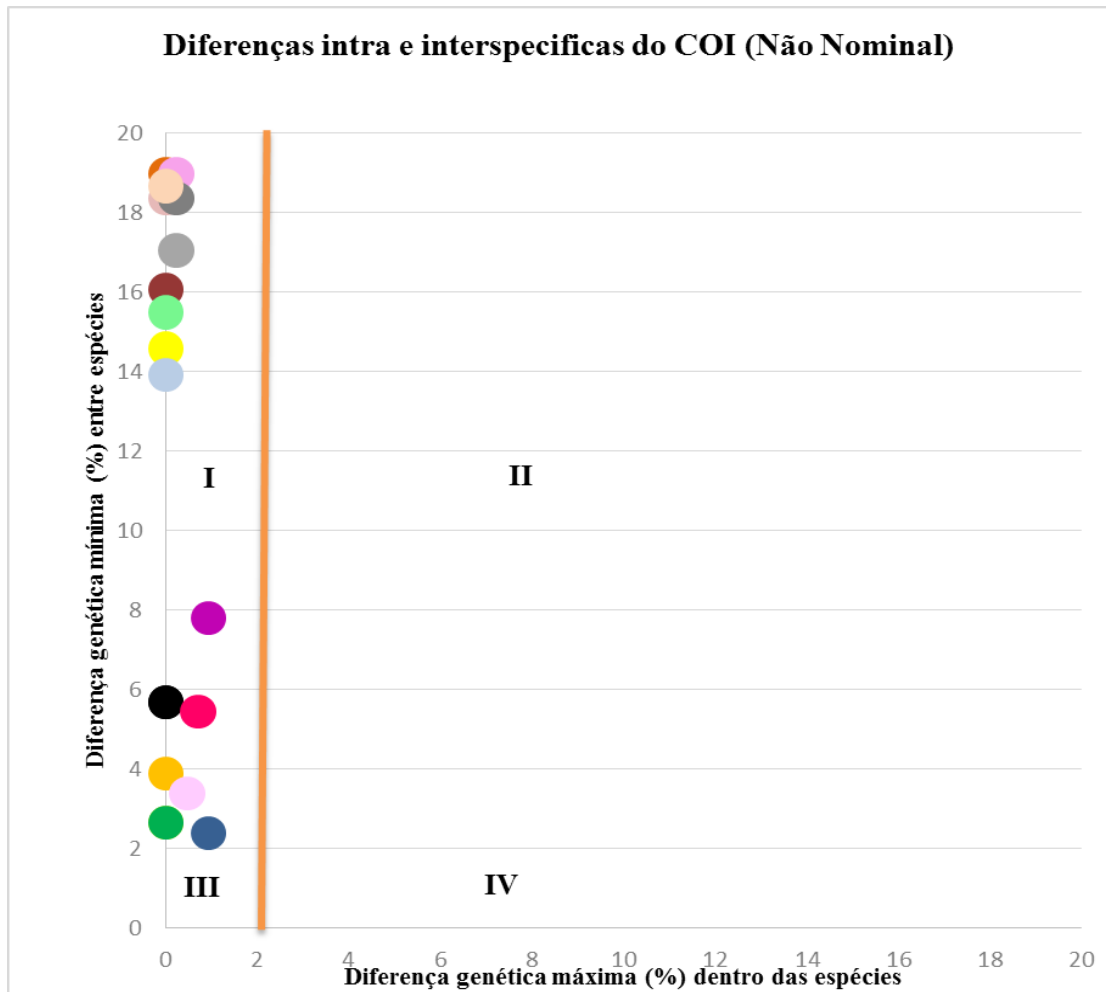
	<b>Mínima</b>	<b>Média</b>	<b>Máxima</b>
intra	0	0,210	0,948
	mínima	média	máxima
inter	2,4	13,779	21,558

Tabela 12 - Comparação da distância média e máxima intraespecífica com a distância do vizinho próximo (NN), (espécies separadas em linhagens).

<b>Espécie</b>	<b>Média intra</b>	<b>Máxima intra</b>	<b>NN</b>	<b>Distância NN</b>
FE_chi	0	0	PE_sem_754	14,581
FE_ind	0,157522876	0,948	FE_ind2_628	2,4
FE_ind2	None	None	FE_ind_A5	2,4
FE_mer	None	None	FE_mer2_630	2,647
FE_mer2	None	None	FE_mer_247	2,647
FE_pen	None	None	FE_mer2_630	3,897
LI_van	None	None	PE_sem_636	16,064
MA_jap	0,292571429	0,473	MA_jap2_044	5,678
MA_jap2	0,631333333	0,947	MA_jap_763	5,678
ME_ker	0	0	MA_jap2_345	15,495
ME_lat	None	None	MA_jap_751	13,926
MP_scul	0	0	PA_cor_956	18,971
MT_dob	0,134904762	0,473	MT_dob2_027	5,451
MT_dob2	0,3312	0,711	MT_dob_M1	5,451
MT_mo	0,031466667	0,236	MT_dob2_012	17,052
MT_steb	0	0	PP_long_676	18,362
PA_cor	0,157333333	0,236	MP_scul_M11	18,971
PE_mon	0,394266667	0,711	PE_mon2_303	7,796
PE_mon2	0,632	0,948	PE_mon_M22	7,796
PE_sem	0,209861111	0,473	PE_sem2_636	3,4
PE_sem2	0,236	0,236	PE_sem_753	3,4
PP_long	0,157333333	0,236	MT_steb_755	18,362
SO_meb	None	None	PP_long_676	18,673

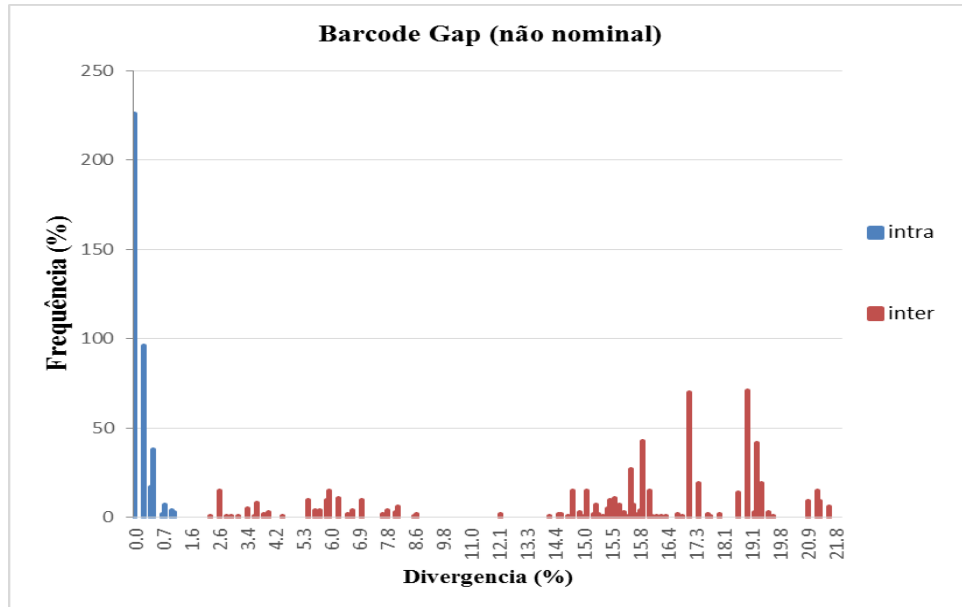
O gráfico do DNA Barcode obtido a partir da análise das espécies separadas por linhagens, apresentou todos os indivíduos no primeiro quadrante. Não foi observado nenhum indivíduo no segundo, terceiro e quarto quadrante (Figura 15). Este achado indica que a ferramenta DNA barcode é eficiente para identificação da família dos peneídeos. O gráfico Barcode Gap (Figura 16) não apresentou sobreposição entre os valores da distância máxima intraespecífica e a distância mínima interespecífica.

Figura 15: Gráfico de DNA barcoding mostrando a diferença máxima dentro das espécies no eixo x (0,948) e mínima entre as espécies eixo y (2,4).



● *F. indicus* (linhagem 1); ○ *F. indicus* (linhagem 2); ● *F. merguensis* (linhagem 2); ○ *F. merguensis* (linhagem 1); ● *P. semisulcatus* (linhagem 2); ○ *P. semisulcatus* (linhagem 1); ● *F. penicillatus*; ● *M. dobsoni* (linhagem 1); ○ *M. dobsoni* (linhagem 2); ● *M. japonicus* (linhagem 1); ○ *M. japonicus* (linhagem 2); ● *P. monodon* (linhagem 1); ○ *P. monodon* (linhagem 2); ● *M. latisulcatus*; ● *F. chinensis*; ● *M. ketathurus*; ● *L. vannamei*; ● *M. monoceros*; ● *M. stebbingi*; ● *S. membranacea*; ● *P. longirostris*; ● *P. coromandelica* e ● *M. scuptilis*.

Figura 16 - Gráfico barcode gap mostrando os valores da distância máxima intraespecífica e mínima interespecífica



### 3.4. Discussão

O presente estudo demonstrou a eficácia da técnica de DNA barcode para identificação dos camarões, além de ter dado uma grande contribuição com 69 sequências depositadas no “Bold System”, pertencentes a nove espécies de peneídeos da costa de Moçambique. A distância genética média intraespecífica nominal foi de 1,2%, valor similar a 1,3% observado por Bilgin et al. (2015) na identificação de 12 espécies de camarão da costa Turca usando a ferramenta DNA Barcode. Os mesmos autores encontraram a distância genética interespecífica média de 21,03%, valor próximo de 17% observado neste trabalho. Entretanto, dividindo as espécies por linhagens conforme a Figura 2, o valor médio da distância genética intraespecífica reduziu de 1,2% para 0,2%, próximo de 0,46% observado por Costa et al. (2007), que com base na mesma ferramenta usada neste trabalho identificaram 150 espécies de crustáceos pertencentes a diferentes famílias. 0,2% é também próximo de 0,51% obtidos por Radulovici et al. (2009) ao identificarem 80 espécies de crustáceos do Estuário e Golf de St Lawrence. Os valores da distância genética encontrados no presente trabalho, quando plotados sem a divisão em linhagens, apresentaram maior parte das espécies no primeiro

quadrante, concordante com a corrente taxonomia. Porém, seis espécies posicionaram-se no segundo quadrante sugerindo a existência de espécies crípticas.

No presente estudo não foi observado um *Barcode Gap*, quando consideradas as espécies nominais, devido à presença de espécies crípticas, havendo sobreposição entre os valores da distância intraespecífica com a distância interespecífica. A sobreposição na distribuição das distâncias genéticas entre os indivíduos de uma mesma espécie e indivíduos de espécies diferentes pode ser causada, ou pela presença de grandes divergências intraespecíficas ou por baixas divergências entre espécies irmãs (HUBERT, 2008). Assim, quando a análise é feita dividindo as espécies em linhagens, um *barcode gap* é observado, indicando que a sobreposição é devida à alta divergência intraespecífica das espécies crípticas.

Alam; Westfall; Pálsson, (2015) fizeram uma análise filogeográfica de *F. indicus* de Bangladesh e, ao compararem as sequências dos camarões desta região com sequências de camarões de diferentes regiões geográficas, observaram a presença de três linhagens evolutivas distintas ou espécies crípticas. *F. indicus* é uma das espécies que apresentou duas linhagens neste trabalho provavelmente porque devido às distâncias geográficas existentes entre *F. indicus* de Moçambique e *F. indicus* cujas sequências foram adquiridas no GenBank.

O estudo de Bilgin et al. (2015) revelou a ocorrência de seis espécies crípticas de camarões das águas da Turquia, por exemplo *Parapenaeus longirostris*, espécie analisada no nosso trabalho e que não se mostrou críptica, provavelmente porque não foram analisados os mesmos exemplares abrangendo todas as regiões geográficas avaliadas pelos autores. Tsoi; Wang; Chu, (2005) avaliaram duas variedades de *M. japonicus* morfologicamente similares da costa de Hong Kong, usando os genes COI e 16S e sugeriram a presença de duas espécies crípticas. *M. japonicus* é uma das espécies crípticas observadas no presente trabalho, deste modo, o resultado obtido por estes pesquisadores é reforçado com o observado na nossa análise.

Hualkasin et al. (2003) analisando camarões do grupo *Fenneropenaeus* da costa Tailandesa e Mar Andaman, utilizando o gene COI, encontraram duas linhagens dentro do grupo *F. merguenses*. *F. merguenses* foi uma das seis espécies que apresentou duas linhagens neste estudo, corroborando o trabalho anterior.

Assim, todas as análises de distância indicam a existência de duas linhagens diferentes em cada uma das seguintes espécies: *M. japonicus*, *F. indicus*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *F. merguensis* e *M. dobsoni*. Particularmente, em *M. dobsoni* (espécie coletada em Moçambique), foram feitas as análises morfológicas (Simbine, 2015; dados não publicados),



mas não existem diferenças com o *M. dobsoni* linhagem da Índia. Para as demais espécies que apresentaram duas linhagens, apesar de se encontrarem no quadrante II, não foi feita análise morfológica. A existência destas linhagens também pode ser devida à diferenciação por distância geográfica entre as populações ou ainda pelas correntes históricas e rotas de colonização (ALAM; WESTFALL; PÁLSSON, 2015). No entanto, para confirmar este achado, faz-se necessário um estudo populacional que inclua maior número de sequências oriundas das regiões geográficas de ocorrência das espécies. O DNA barcoding não é um substituto das análises taxonômicas convencionais, mas aponta casos em que existe uma grande divergência entre indivíduos agrupados como uma espécie. Assim, sempre que surja alguma dúvida, deve-se recorrer a um estudo mais profundo que inclua, além da análise molecular, a taxonomia morfológica e a ecologia da espécie para que uma correta decisão seja tomada (Costa et al., 2007).

Os resultados constituem uma base fundamental de informação sobre o conhecimento genético das variedades dos camarões existentes em Moçambique, para a sua gestão e conservação. A técnica DNA barcoding permitiu identificar corretamente as espécies de peneídeos economicamente importantes no país e verificar que grande parte das linhagens se apresenta geneticamente diferenciada das espécies de ocorrência em outras regiões oceânicas, como é o caso das espécies: *F. indicus*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *M. dobsoni* e *M. japonicus*. Mais estudos devem ser feitos para uma melhor compreensão das variedades genéticas destes camarões, para subsidiar a tomada de uma decisão correta em relação ao estado taxonômico.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo genético que avalia a estrutura e variabilidade genética dos camarões *F. indicus* e *M. monoceros* da costa moçambicana. Pela primeira vez foram identificadas espécies de peneídeos de importância comercial desta costa. Os resultados são de grande importância sobre o conhecimento genético das variedades dos camarões existentes em Moçambique irão contribuir para o seu monitoramento, gestão e conservação.

Seria interessante expandir-se o estudo da variabilidade genética de *F. indicus* e *M. monoceros* para outras áreas vizinhas tais como Tanzânia, Madagascar e África do Sul para investigar até que ponto as correntes marinhas desta região da África Austral contribuem para dispersão larval e para saber se o isolamento por distância poderia ser aplicado para as populações de camarões peneídeos ao longo da costa leste de África. Numa perspectiva de gestão pesqueira regional, o conhecimento adquirido a partir deste estudo poderia revelar se os estoques de camarão são ou não partilhados entre os países vizinhos.

Apesar de o estudo não ter revelado que as espécies se encontram sobre ameaça, sabendo que o *F. indicus* e o *M. monoceros* são espécies de grande importância para Moçambique e sabendo através da literatura que estas já apresentam um declínio populacional, medidas com vistas a conservar estes camarões devem ser tomadas. Uma vez que as duas espécies não estão estruturadas, estas devem ser aplicadas ao longo de toda a costa moçambicana. Além do período de defeso que já é implementado no país, seria interessante que incluísse medidas como:

- a) Controle da destruição dos manguezais;
- c) Adotar políticas de controle de espécies exóticas monitorando as atividades de piscicultura de forma a evitar o cultivo de espécies exóticas no país;
- d) Fiscalizar a descarga das águas de lastro de navios nos portos com relevância para exportação /importação e criar centros de tratamento das águas de lastro antes de serem lançadas no meio natural;
- e) Elaborar programas de sensibilização do público sobre o perigo da destruição dos manguezais e explicar como as espécies exóticas e ou invasoras podem prejudicar as nativas;
- f) Mais estudos devem ser feitos para o conhecimento da verdadeira razão que provoca o declínio destas populações.

O trabalho permitiu identificar corretamente as espécies de peneídeos economicamente importantes no país e verificar que grande parte das espécies possuem linhagens geneticamente diferenciadas das ocorrentes em outras regiões oceânicas, como é o caso das

espécies: *F. indicus*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *M. dobsoni* e *M. japonicus*, contradizendo a hipótese de que não há incertezas taxonômicas na costa Moçambicana.

No que diz respeito ao componente taxonômico e a partir dos resultados, sugerimos que mais estudos devam ser feitos abrangendo todas as regiões de ocorrência natural de cada uma das espécies que apresentaram duas linhagens no presente trabalho. Este estudo deve incluir a componente genética usando diferentes marcadores moleculares nucleares, morfologia e ecologia, de forma que uma correta decisão seja tomada em relação ao estado taxonômico destas espécies.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABREU, M. J.; SANTOS-WISNIEWSKI, I.; ROCHA, M. J. I.; ORLANDO, T. C. I. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) and *Ceriodaphnia silvestrii* (Daday, 1902) (Crustacea Cladocera). **Braz.J. Biol.** São Carlos Vol.70, no.1, 121-124, fev. 2010.
- ALAM, M. M. M.; WESTFALL, K. M.; PÁLSSON, S. Mitochondrial DNA variation reveals cryptic species in *Fenneropenaeus indicus*. **Bull Mar Sci.** 91(1):15–31. 2015.
- ASCLME/SWIOFP. **Transboundary Diagnostic Analysis for the Western Indian Ocean.** Volume 1: Baseline. 2012. Disponível em: <[https://archive.org/details/ASCLME\\_SWIOFP\\_TDA](https://archive.org/details/ASCLME_SWIOFP_TDA)>. Acesso em 20 setembro 2014.
- ATES, A. S.; KATAGAN, T.; SEZGIN, M.; OSCAN, T. Exotic crustaceans of the Turkish coast. **Arthropods.** 2 (1): 20-25. 2013. Disponível em: [www.iaees.org](http://www.iaees.org). Acesso em 14 de Setembro 2013.
- AVISE, J. C. NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **J. Mol. Evol.** 20:99-105. 1984.
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, 1994. 511pp.
- BALDWIN, J. D.; BASS, A. L.; BOWEN, B. W.; CLARK, W. C. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. **Molecular Phylogenetic Evolution** 10:399-407, 1998.
- BANDEL, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16: 37-48, 1999.
- BEERKIRCHER, L.; AROCHA, F.; BARSE, A.; PRINOE, E.; RESTREPO, V.; SERAFY, J.; SHIVJI, M. S. Effects of species misidentification on population assessment of overfished white marlin *Tetrapturus albidus* and roundscale spearfish *T. georgii*. **Endarg. Spec. Res.** 9,81-90, 2009.
- BENZIE, J. A. H. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aqua Res** 31: 95-119, 2000.
- BILGIN, R.; UTKAN, M. A.; KALKAN, E.; KARHAN, S. U.; BEKBOLET, M. DNA barcoding of twelve shrimp species (Crustacea: Decapoda) from Turkish seas reveals cryptic diversity. **Mediterranean Marine Science.** <<http://www.medit-mar.sc.net>>. DOI:<http://dx.doi.org/10.12681/mms.548>, 2015.
- BRIGGS, J. C. Coincident biographic patterns: Indo-West Pacific Ocean. **Evolution** 53, 1999.
- BRITO, A. J. **Prediction of shrimp biomass and catch using biomass dynamic and recruitment modeling.** 2001. 69 pp. Master's thesis. The Florida Agricultural and Mechanical University, USA, 2001.

BRITO, A. J. **Studies on the ecology of penaeid shrimps in the sofala bank of mozambique: implications for management and sustainability of the fishery.** 2010. 165pp. Doctoral thesis. The Florida Agricultural and Mechanical University, USA, 2010.

BUHAY, J. E. “Coi-like” Sequences are becoming problematic in molecular systematic and dna barcoding studies. **Journal of crustacean biology.** 29 (1): 96–110, 2009.

CARPENTER, K. E.; NIEM, V. H. (eds) FAO species identification guide for fishery pur the environmental sciences institute poses. **The living marine resources of the Western Central Pacific.** Volume 2. Cephalopods, crustaceans, holothurians and sharks. Rome, FAO. 687-1396 p. 1998.

CHAN, T. Y. Shrimps and prawns. In: Carpenter, K.E. & Niem, V.H. (Eds), FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. **The Living Marine Resources of the Western Central Pacific.** FAO, Rome, pp. 851–971, 1998.

CHAN, T. Y.; TONG, J.; TAM, Y. K.; CHU, K. H. Phylogenetic relationships among the genera of the Penaeidae (Crustacea:Decapoda) revealed by mitochondrial 16S rRNA gene sequences. **Zootaxa** 1694. 38-50, 2008.

COATES, A. G.; JACKSON, J. B. C.; COLLINS. L.S.; CRONIN, T. M.; DOWSETT, H. J.; BYBELL, L. M.; JUNG, P.; OBANDO, J. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. **Geol Soc Am Bull** 104, 814-828, 1992.

COSTA, F. O.; DE WAARD, J. R.; BOUTILLIER, J.; RATNASINGHAM, S.; DOOH, R. T.; HAJIBABAEI, M.; HEBERT, P. D. N. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 64: 272-295, 2007.

COUCEIRO, L.; BARREIRO, R.; RUIZE, J. M.; SOTKA, E. E. Genetic isolation by distance among populations of the netted dog whelk *Nassarius reticulatus* (L.) along the European Atlantic coastline. **Journal of Heredity** 98: 603–610, 2007.

COWEN, R. K.; SPONAUGLE, S. Larval dispersal and marine population connectivity. **The Annual Review of Marine Science**, 1, 443-66, 2009.

CRIALES, M. M.; WANG, J.; BROWDER, J. A.; ROBBLEE, M. B. Tidal and seasonal effects con transport of pick shrimp postlarvae. **Marine Ecology Progress Series** 286, 231-238, 2005.

DALL, W. Recent molecular research on *Penaeus* sensu lato. **Journal of Crustacean Biology** 27, 380-382, 2007.

DALL. W.; HILL, B. J.; ROTH LISBERG, N. W.; STAPLES, D. J. **Advances in Marine Biology.** The Biology of Penaeidae London. Academic Press. 1990. 27. 489 p.

DE CROOS M. D. S. T.; PÁLSSON S. Population biology and genetic diversity of two shrimp (*Parapenaeopsis coromandelica*) populations exploited under different fishing pressures in the coastal waters of Sri Lanka. **Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom**, 92 (4):819-829, 2011.

- DE CROOS, M. D. S. T.; PÁLSSON, S. Mitochondrial DNA variation and populations genetic structure of white shrimp *Fenneropenaeus indicus* along the coastal belt of Sri Lanka. **Aquatic Living Resour.** 23: 315-323, 2010.
- DE FRANCISCO, A. K.; GALETTI, P. M. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analysis, **Genetic Molecular Biology** 28:258-261, 2005.
- DE GRAVE, S.; FRANSEN, C. H. J. M. *Carideorum catalogus*: the recent species of the dendrobranchiate stenopodidean, procarididean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zool. Med. Leiden** 85(9): 30.ix:196-589 figs 1-59, 2011.
- DEL MUNDO, C. M. Philippine decapod crustaceans. **An illustrated handbook on the commercially important decapod crustacean of the Philippines**. Fisheries Resources evaluation and environmental Services Division, Bureau of Fisheries and Aquatic Resources, Quezon City, Philippines, 2000. 83 p.
- DOMINGUEZ, R. R.; AMORIM, A. F.; HILSDORF, A. W. S. Genetic identification of *Carcharhinus* sharks from the southwest Atlantic Ocean (Chondrichthyes: CARCHARHINIFORMES). **JOURNAL OF APPLIED ICHTHYOLOGY**. ISSN 0175-8659, 2013.
- DUGGAN, I. C.; ROBINSON, K. V.; BURNS, C. W.; BANKS, J. C.; HOGG, I. D. Identifying invertebrate invasions using morphological and molecular analyses: North American *Daphnia* “pulex” in **New Zealand fresh waters** 7: 585-590, 2012.
- DUMONT, L. F. C.; HWANG, G. L.; MACLEAN, N. The mtDNA Control Region Of The Barba-Ruça Shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeidae) And Its Potential Use As A Marker For Population Analysis. **Atlântica, Rio Grande**, 31(2): 199-207, 2009.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin Ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics** online, 1:47-50, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131:479-491, 1992.
- FAO, FID/CP/MOZ **Fishery Country Profile**. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/oldsite/FCP/en/nam/profile.htm>. Acesso: 27 de Setembro de 2013.
- FAO. **Governo de Moçambique. Quadro das Demandas e Propostas de Guiné-Bissau para o Desenvolvimento de um Programa Regional de Cooperação entre Países da CPLP no domínio da Luta contra a Desertificação e Gestão Sustentável das Terras**. TCP CPLP/FAO -MADRRM, orgs: MOSQUITO, D.; SAMO, G; DE DEUS, N. 2009. Disponível: Site do TCP CPLP/FAO [www.fao.org/tc/cplpunccd](http://www.fao.org/tc/cplpunccd). Acesso: 24 de Setembro de 2013.
- FISHER, R. A. **The genetically theory of natural selection**. Oxford Charendon Press. 1930.
- FISHER, W.; SOUSA, I.; SILVA, C.; FREITAS, DE A.; POUTIERS, J. M.; SHNEIDER, W.; BORGES, T. C.; FERAL, J. P.; MASSINGA, A. Fichas FAO de identificação de espécies

para actividade de pesca. **Guia de Capo das espécies comerciais marinhas e de águas salobras de Moçambique**. Publicação preparada em colaboração com o Instituto de Investigação Pesqueira de Moçambique, com o financiamento do Projecto PNU/FAO MOZ/86/030 e de NORAD. Roma, FAO. 1990. 424 p.

FLEGEL, T.W. **The right to refuse revision in the genus *Penaeus***. *Aquacultures*. 264, 2-8, 2007.

FORBES, A. T.; DEMETRIADES, N. T. **A review of the commercial, shallow water penaeid prawn resource of South Africa**. Status, Fisheries, Aquaculture and Management. 2005. Disponível em: <http://cernm.nmmu.ac.za> (Acesso em 05 de Agosto de 2013).

GARCÍA, S. E LE RESTE, L. **Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros**. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO Série Documento Técnico de Pesca, 203: 180 p. 1987.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 270: 313–21, 2003.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2:1657-1663. doi:10.1371/journal.pbio.1001127, 2004.

HOLTHUIS, L. B. Species Catalogue. Vol 1 **Shrimps and prawns of the world**. FAO Fish. Synop.125, 1-271, 1980.

HRBEK, T.; MEYER, A. Closing of the Tethys Sea and phylogeny of Eurasian Killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Journal of Evolutionary Biology* 16, 17-36, 2003.

HUALKASIN, W.; SIRIMONTAPORN, P.; CHOTIGEATA, W.; QUERCIC, J.; PHONGDARA, A. Molecular phylogenetic analysis of white prawns species and the existence of two clades in *Penaeus merguensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 296:1– 11, 2003.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; *et al.* Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490, 2008.

IMAI, H.; HANAMURA, Y.; CHENG, JIN-HUA. Genetic and morphological differentiation in the Sakura shrimp (*Sergia lucens*) between Japanese and Taiwanese populations. *Contributions to Zoology*, 82 (3): 123-130, 2013.

KEIGWIN, L. D. Pleiocene closing of the isthmus of Panama based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific and Caribbean sea cores. *Geology* 6, 630-643, 1978.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*.; 28(12), 1647-1649, 2012.

- KHAMNAMTONG, B.; KLINBUNGA, S.; MENASVETA, P. Genetic Diversity and Geographic Differentiation of the Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand Analyzed by Mitochondrial COI Sequences. **Biochem Genet** 47:42–55, 2009.
- KHEDKAR, G. D.; REDDY, A. C.; RON, B. T.; E HAYMER, D. High levels of genetic diversity in *Penaeus monodon* populations from the east coast of India **SpringerPlus**, 2013, 2:671. Disponível em: <http://www.springerplus.com/content/2/1/671>. Acesso em: 20 Março, 2015.
- KUMAR, C. P.; JOHN, B. A.; KHAN, S. A.; LYLA, P. S.; JALAL, K. C. A. Limit of DNA Barcode in Delineating *Penaeus monodon* and in its Developing Stages. **Sains Malaysiana** 41 (12): 1527-1533, 2012.
- LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic Population Structure of Fishes: Implications for Coastal Zone Management. **AMBIO; A Journal of the Human Environment** 34, 111-119, 2005.
- LAMONT, T.; BARLOW, R. G.; MORRIS, T.; VAN DEN BERG, M. A. Characterization of mesoscale features and phytoplankton variability in the Mozambique Channel. **Deep-Sea Research II** 100: 94-105, 2014.
- LAVERY, S.; CHAN, T. Y.; TAM, Y. K.; CHU, K. H. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA. **Mol. Phylogenetic Evol** 31:39–49, 2004.
- LEFÉBURE, T.; DOUADY, C. J.; GOUY, M.; GIBERT, J. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40, 435–447, 2006.
- LEUNG, P.; ENGLE, E. Shrimp culture: Economics, market, and trade. **World Aquaculture Society and Blackwell Publishing**, 2006.
- LI, Y. L.; KONG, X.Y.; YU, Z. N.; KONG, J.; MA, S.; CHEN, L. M. Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai sea based on mitochondrial DNA analysis. **African Journal of Biotechnology** Vol. 8 (7), pp. 1193-1202, 2009.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25:1451-1452, 2009.
- LIS, J. T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. **Methods Enzymol.** 65, 347–353, 1980.
- MA, K. Y.; CHAN, T. Y.; CHU, K. H. Refuting the six-genus classification of *Penaeus* s.l. (Dendrobranchiata, Penaeidae): a combined analysis of mitochondrial and nuclear genes. **Zoologica Scripta** 40, 498-508, 2011.
- MA, K. Y.; CHAN, T.Y.; CHU, K. H. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 53, 45-55, 2009.



- MACIE, A. Juvenile Penaeid Shrimp Density, Spatial Distribution and Size Composition in four adjacent habitats within a Mangrove-Fringed Bay on Inhaca Island, Mozambique. Western Indian Ocean **J. Mar Sci.** Vol. 3, No. 2: 163-178, 2004.
- MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D.; MACLEAN, N.; D'INCAO, F. Molecular phylogeny of western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 18, 66-73, 2001.
- MCMILLEN-JACKSON, A. L.; BERT, T. M. Genetic Diversity In The mtDNA Control Region And Population Structure In The Pink Shrimp *Farfantepenaeus Dourarum* **Journal Of Crustacean Biology**, 24(1): 101–109, 2004.
- MINISTÉRIO DAS PESCAS-MOÇAMBIQUE. **Proposta De Plano De Gestão Das Pescarias De Camarão Do Banco De Sofala, 2013 – 2017**. Disponível em: [http://www.adnap.gov.mz/documentos/plano/PG\\_Camarao\\_2013.pdf](http://www.adnap.gov.mz/documentos/plano/PG_Camarao_2013.pdf). 2012. Acesso EM 13-04-2015.
- MKARE, T. K. **Genetic Population structure of penaeid prawns *Penaeus monodon* Fabricius 1798, *Fenneropenaeus indicus* H. Milne Edwards 1837 and *Metapenaeus monoceros* Fabricius 1798 in the Malindi-Ungwana Bay, Kenya**. (Msc thesis) Stellenbosch University, Faculty of Science Department of Botany and Zoology, 2013.
- MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **PLoS Biol** 9(8): e1001127, 2011.
- MUNASINGHE, D. H. N. **Availability of Morphologically Similar, Genetically Diverge *Penaeus monodon* Populations in Sri Lanka**, In: Proceedings Book of ICETSR, Malaysia, Handbook on the Emerging Trends in Scientific Research, Pak Publishing Group, Growing Knowledge, 690-698, 2014.
- PALHA DE SOUSA, L.; BRITO, A.; HOWEL, D. **O camarão do Banco de Sofala 2005**, The shallow water shrimp fishery at Sofala Bank in Mozambique 2005. Unpublished. Report, June 2005.
- PASCOAL, A.; VELAZQUEZ J. B.; ORTEA, I.; CEPADA, A.; GALLARDO, J. M.; CALO-MATA, P. Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. **Food Chemistry**. 125: 1457-1461, 2011.
- PÉREZ FARFANTE, I. & KENSLEY, B. F. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. **Mém. Nat. Mus. Nat.**, 175, 1-233, 1997.
- PEREZ, J. E.; ALFONSI, C.; BIRCHIO, M.; MUNOZ, C.; GOMEZ, J. A. The Introduction of exotic species in aquaculture a solution or part of the problem? **Ensaio. Interciencia**. Vol. 28 n°4. 2003.
- PIMENTEL, D. Biological invasions: **economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species**. New York: Cornell University, 2002, 384 p.
- PRIMAVERA, J. H. Notes on the courtship and mating behavior in *Penaeus monodon* Fabricius (Decapoda, Natantia). **Crustaceana** 37, 287-292, 1979.

- QUAN, J.; ZHUANG, Z.; DENG, J.; DAI, J.; ZHANG, Y. Phylogenetic Relationship of 12 Penaeodea Shrimp Species Deduced from Mitochondrial DNA Sequences. **Biochemical Genetics** 42, 331-345, 2004.
- RAFINESQUE C.S. [-SCHMALTZ]. Analyse de la Nature ou Tableau de l'univers et des corps organisés: 1-224. Palerme, 1815.
- RADULOVICI, A. E.; BERNARD, SAINTE-MARIE; FRANCE, D. Barcoding Arthropods DNA barcoding of marine crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: a regional-scale approach. **Molecular Ecology Resources**. 9 (Suppl. 1), 181–187, 2009.
- REYNOLDS, L. K.; MCGLATHERY, K. J.; WAYCOTT, M. Genetic Diversity enhances Restoration Success by Augmenting Ecosystem Services. **PLoS ONE** 7, e38397, 2012.
- RODRIGUEZ, C. F.; BECARES, E.; FERNANDEZ-ALAEZ, M.; FERNANDEZ ALAEZ, C. Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. **Biological Invasions** 7: 75-85, doi:10.1007/s10530-004-9636-7, 2005.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes in the distribution of pairwise genetic differences. **Mol. Biol. Evol.** 9: 552-569, 1992.
- RÖNNEBÄCK, P; MACIE, A; ALMQVIST, G; SCHULTZ, L; TROELL, M. Do penaeid Shrimps have a Preference for Mangrove habits? Distribution Pattern Analysis on Inhaca Island, Mozambique. Estuarine, **Coastal and Shelf Science**. 55, 427-436, 2002.
- SAKAY, K.; SHINOMIYA, S. Preliminary Report on Eight New Genera Formerly Attributed to Parapenaeopsis Alcock, 1901, sensu Lato (Decapoda, Penaeidae) **Crustaceana** 84 (4): 491-504, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SEBERG, O. The future of systematics: Assembling the Tree of Life. **The Systematist** 23: 2-8, 2004.
- SIMON, C. **Molecular systematic at the Species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA**. In Hewitt GM, Johnston AWJ, Young JP, eds. Molecular techniques in taxonomy. New York: Springer-Verlag, 1991.
- SIMBINE, L.; MARQUES, C. G.; FREITAS, P. D.; SAMUCIDINE, K. E.; GUSMÃO, J.; TAVARES, C.; GALETTI JUNIOR, P. M. mtDNA and morphology analyses revealed *Metapenaeus dobsoni* as the invasive shrimp species (Penaeidae) in Mozambican coastal waters. (Dados não publicados). 2014.
- SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified **The National Academy of Sciences of the USA**. Vol: 105 (36). Doi 10.1073/pnas.0803076105, 2008.
- SUDHAKARA, R.G.; RADHAKRISHNAN, E. V.; JOSE, J. **Hand Book of Marine Prawns of India**. Central Marine Fisheries Research Institute. Printed at St. Francisco Press.

Kochi-682018, 2013.

TAJIMA, F. The amount of DNA phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Genetics** 143: 1457-1465, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24:1596-1599, 2007.

TEIKWA, E. D.; MGAYA, Y. D. Abundance and Reproductive Biology of the Penaeidae Prawns of Bagamoyo Coastal Waters, Tanzania. Western Indian Ocean **J. Mar. Sci.** Vol. 2, No. 2, pp. 117–126, 2003.

TERNON, J. F.; BACH, P.; BARLOW, R.; HUGGETT, J.; JAQUEMET, S.; MARSAC, F.; MÉNARD, F.; PENVEN, P.; POTIER, M.; ROBERTS, M. J. The Mozambique Channel: From physics to upper trophic levels, Deep Sea Research Part II: **Topical Studies in Oceanography**, Volume 100: 1-9, 2014.

TESKE, P. R.; HAMILTON, H.; MATTHEE, C. A.; BARKER, N. P. Signatures of seaway closures and founder dispersal in the phylogeny of a circumglobally distributed seahorse lineage. **BMC Evolutionary Biology** 7, 138, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBRON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, 22: 4673-4680, 1994.

TSOI, K. H.; WANG, Z. Y.; CHU, K. H. Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. **Marine Biology** 147: 367–379. DOI 10.1007/s00227-005-1585-x, 2005.

TZENG, TZONG-DER. Population Structure of the Sword Prawn (*Parapenaeopsis hardwickii*) (Decapods: Penaeidae) in The East China Sea and Waters Adjacent to Taiwan Inferred from the Mitochondrial Control Region. **Zoological Studies** 46(5): 561-568, 2007.

VASEEHARAN, B.; RAJAKAMARAN, P.; JAYASEELAN, D.; VINCENT, A.Y. Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. **Aquaculture Int.** 21: 219-241, 2013.

VILA, C.; MALDONADO, J. E.; WAYNE, R. K. Phylogenetic Relationships, Evolution and Genetic Diversity of the Domestic Dog. **The American Genetic Association**, v.90, p.71-77, 1997.

VOLOCH, C. M.; FREIRE, P. R.; RUSSO, C. A. M. Molecular phylogeny of penaeid shrimps inferred from two mitochondrial markers. **Genetics and Molecular Research** 4, 668-674, 2005.

WARD, R. D. Genetics in Fisheries Management. **Hydrobiology**. 420, 191-201, 2000.

WIEMERS, M.; FIEDLER, K. Does the DNA barcoding gap exist? A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). **Frontiers in Zoology**. 4, 16, 2007.

WU, L. W.; LIU, C. C.; LIN, S. M. Identification of exotic sailfin Catfish Species (*Pterygoplichthys*, *Loricariidae*) in Taiwan Based on Morphology and mtDNA Sequences. **Zoological Studies** 50(2): 235-236, 2011.

YANO, I.; KANNA, R. A.; OYAMA, R. N.; WYBAN, J. A. Mating behaviour in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. **Marine Biology** 97, 171-175, 1988.

ZHANG, J. W.; CHEN, B. Environment patterns and influential factors of biological invasions: a worldwide survey. Proceedings of the International **Academy of Ecology and Environmental Sciences**, 1(1):1-14, 2011.

**ANEXO A - SEQUÊNCIAS DE ESPÉCIES OBTIDAS DO GENBANK. NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK, NOME DO GÊNERO E DA ESPÉCIE, DESIGNAÇÃO USADA NA ANÁLISE E LOCAL DE ORIGEM DA SEQUÊNCIA**

<b>Acesso no GenBank</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nova designação</b>	<b>Origem</b>
333795988	<i>Parapenaepsis</i>	<i>coromandelica</i>	PA_cor_988	Sri Lanka
333795956	<i>Parapenaepsis</i>	<i>coromandelica</i>	PA_cor_956	Sri Lanka
333795960	<i>Parapenaepsis</i>	<i>coromandelica</i>	PA_cor_960	Sri Lanka
338843160	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_160	India
557955628	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_628	Filipinas
453805247	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>merguiensis</i>	FE_mer_247	India
573464303	<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_303	Filipinas
557955634	<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_634	Filipinas
557955638	<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_638	Filipinas
510786385	<i>Melicertus</i>	<i>kerathurus</i>	ME_ker_385	Turkey
510786383	<i>Melicertus</i>	<i>kerathurus</i>	ME_ker_383	Turkey
510786387	<i>Melicertus</i>	<i>kerathurus</i>	ME_ker_387	Turkey
510786347	<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_347	Turkey
510786345	<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_345	Turkey
530759024	<i>Metapeaneus</i>	<i>dobsoni</i>	ME_dob_024	India
530759012	<i>Metapeaneus</i>	<i>dobsoni</i>	ME_dob_012	India
530759030	<i>Metapeaneus</i>	<i>dobsoni</i>	ME_dob_030	India
530759033	<i>Metapeaneus</i>	<i>dobsoni</i>	ME_dob_033	India
530759039	<i>Metapeaneus</i>	<i>dobsoni</i>	ME_dob_039	India
530759027	<i>Metapeaneus</i>	<i>dobsoni</i>	ME_dob_027	India
367056725	<i>Parapenaeus</i>	<i>longirostris</i>	PP_long_725	Italia
367056723	<i>Parapenaeus</i>	<i>longirostris</i>	PP_long_723	Italia
				Atlântico-
351736676	<i>Parapenaeus</i>	<i>longirostris</i>	PP_long_676	Mediterrâneo
557955630	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>merguiensis</i>	FE_mer_630	Filipinas
557955636	<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_636	Filipinas
374717660	<i>Solenocera</i>	<i>membranacea</i>	SO_mem_660	Portugal
7374113	<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_113	Australia

107784950	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>chinensis</i>	FE_chi_950	Qingdao, China
109692170	<i>Litopenaeus</i>	<i>vannamei</i>	LI_van_170	Qingdao, China
63003723	<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_723	Japão
	<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	Ma_jap_040	Japão
787593026	<i>Fenneropenaeus</i>	<i>penicillatus</i>	FE_pen_026	Mexico

### ANEXO B - NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS POR LOCALIDADE E POR REGIÃO DO mtDNA, NOME DA ESPÉCIE

Locais	<i>F. indicus</i>			<i>M. monoceros</i>		
	COI	Cyt b	Dloop	COI	Cyt b	Dloop
<b>Angoche</b>	13	6	6	19	7	16
<b>Quelimane</b>	22	9		13	9	
<b>Sofala</b>	17	14		18	14	
<b>Maputo</b>	25	11	7	20	20	9

### ANEXO C - SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO BOLD SYSTEMS, NOME DO GÊNERO E ESPÉCIE, CÓDIGO COM O QUAL A SEQUÊNCIA FOI DEPOSITADA

Gênero	Espécie	Código atribuído
<i>Mierspenaeopsis</i>	<i>sculptilis</i>	MP_scul_M12
<i>Mierspenaeopsis</i>	<i>sculptilis</i>	MP_scul_M11
<i>Mierspenaeopsis</i>	<i>sculptilis</i>	MP_scul_S29
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A63
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_Z53
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A64
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A62
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_Z55
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_Z52
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_S32
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_Z54
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A4
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A3
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A2

<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_769
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A1
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_M20
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_Z51
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_770
<i>Fenneropenaeus</i>	<i>indicus</i>	FE_ind_A5
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_B1
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_B2
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_Z43
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_760
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_M22
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	PE_mon_Z41
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_754
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_A69
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_M78
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_M81
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_753
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_A68
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_M80
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_A67
<i>Penaeus</i>	<i>semisulcatus</i>	PE_sem_M79
<i>Melicertus</i>	<i>latisulcatus</i>	ME_lat_752
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_M2
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_A57
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_751
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_M1
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_764
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_763
<i>Marsupenaeus</i>	<i>japonicus</i>	MA_jap_A56
<i>Metapenaeus</i>	<i>stebbingi</i>	MT_steb_756
<i>Metapenaeus</i>	<i>stebbingi</i>	MT_steb_M76
<i>Metapenaeus</i>	<i>stebbingi</i>	MT_steb_755
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_771

<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_772
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_M73
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_S24
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_M72
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_S25
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_M71
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_M5
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_B3
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_B2
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_B1
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_E4
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_E1
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_M74
<i>Metapenaeus</i>	<i>monoceros</i>	MT_mo_Z40
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_765
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M10
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M5
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M9
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M2
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M3
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M1
<i>Metapenaeus</i>	<i>dobsoni</i>	MT_dob_M4

---



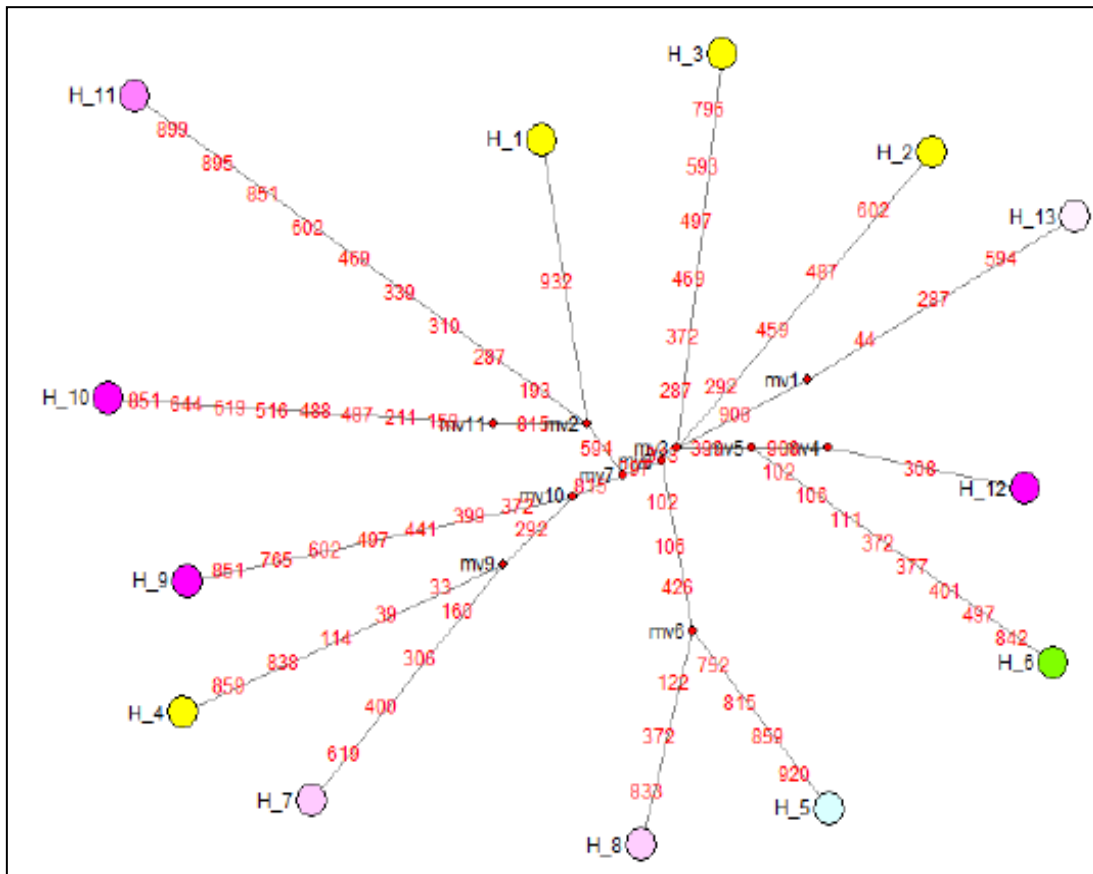
## ANEXO D – SEQUÊNCIA DO GENE CYT B PARA AS ESPÉCIES *Fenneropenaeus indicus* E *Metapenaeus monóceros*

Identity	1	10	20	30	40
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	50	60	70	80	90
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	100	110	120	130	
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	140	150	160	170	180
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	190	200	210	220	
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	230	240	250	260	270
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	280	290	300	310	
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	320	330	340	350	360
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	370	380	390	400	
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	410	420	430	440	450
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	460	470	480	490	
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	500	510	520	530	540
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	550	560	570	580	
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				
Identity	590	600	603		
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - cyt b	[Green bar]				
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - cyt b	[Green bar]				

# ANEXO E – SEQUÊNCIA DA REGIÃO D-LOOP PARA AS ESPÉCIES *Fenneropenaeus indicus* E *Metapenaeus monoceros*

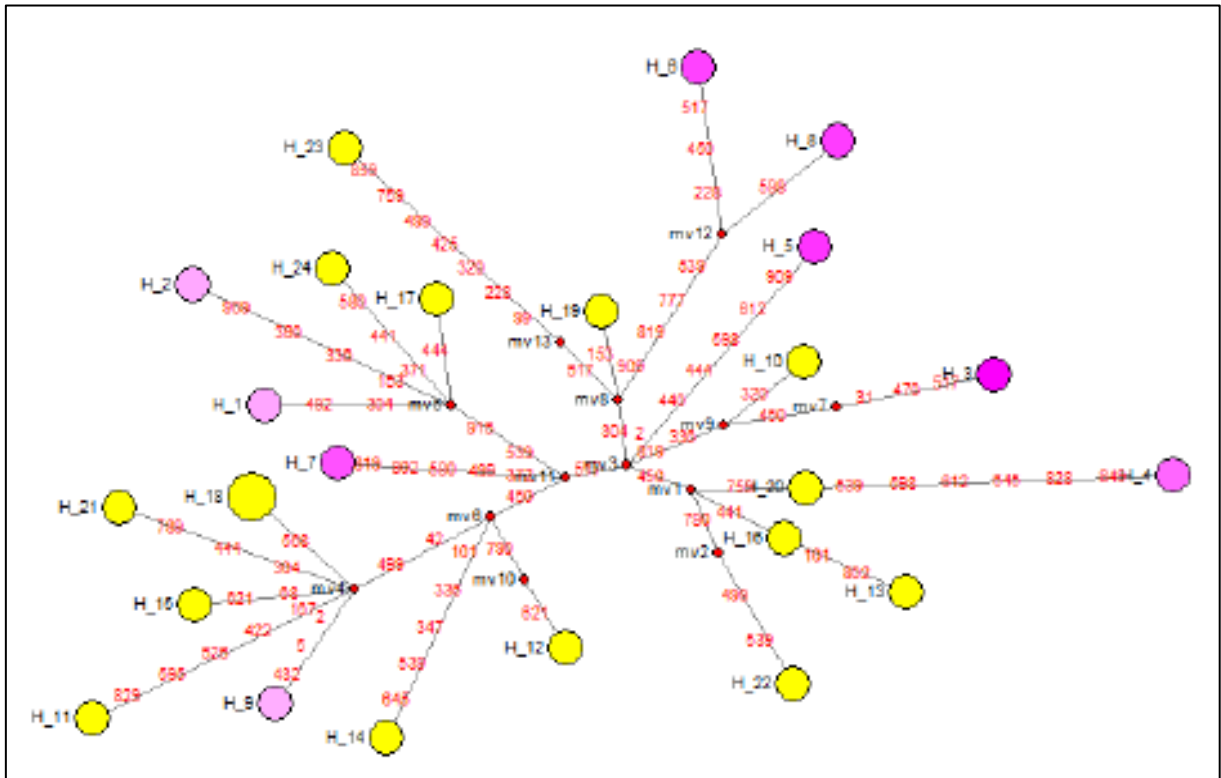
Identity	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	.....CCTT..T..TT..G..GTT..A..GT..C..GAC..CTGC										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	.....CCTT..T..TT..G..GTT..A..GT..C..GAC..CTGC										
Identity	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	GTTG...T...T...T...GTAC...TTT...A...A...A...-...C...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	GTTG...T...T...T...GTAC...TTT...A...A...A...-...C...T...T...										
Identity	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...T...TTT...CCAT...TT...TG...A...CAAACT...T...TC...CT...G										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...T...TTT...CCAT...TT...TG...A...CAAACT...T...TC...CT...G										
Identity	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	A...A...TGA...TCGT...T...TA...A...A...ACTGT...CA...AA...TA										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	A...A...TGA...TCGT...T...TA...A...A...ACTGT...CA...AA...TA										
Identity	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...CAC...GCT...AGA...C...T...G...ACCTAT...G...G...C...CA...CT										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...CAC...GCT...AGA...C...T...G...ACCTAT...G...G...C...CA...CT										
Identity	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...CACC...T...G...TCGACAGT...-...ACGT...CTAGAA...-...-...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...CACC...T...G...TCGACAGT...-...ACGT...CTAGAA...-...-...										
Identity	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...CT...GCAC...AA...A...T...A...A...ACT...C...T...A...A...A...T										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...CT...GCAC...AA...A...T...A...A...ACT...C...T...A...A...A...T										
Identity	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	.ATG...GA...A...G...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	.ATG...GA...A...G...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
Identity	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	AG...A...-...AG...A...T...T...TA...T...A...-...T...A...-...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	AG...A...-...AG...A...T...T...TA...T...A...-...T...A...-...										
Identity	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...GAT...TAGG...C...GCA...T...T...T...A...A...A...C...A...GCC										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...GAT...TAGG...C...GCA...T...T...T...A...A...A...C...A...GCC										
Identity	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...AA...CT...G...A...C...G...T...T...T...G...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...AA...CT...G...A...C...G...T...T...T...G...T...T...T...T...T...T...										
Identity	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	.AA...-...AGA...TGT...-...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	.AA...-...AGA...TGT...-...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
Identity	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...AG...G...T...AA...T...A...C...T...A...T...G...G...G...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...AG...G...T...AA...T...A...C...T...A...T...G...G...G...T...T...T...										
Identity	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	T...C...C...AG...CC...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	T...C...C...AG...CC...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
Identity	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	G...-...-...-...C...T...A...T...G...A...-...T...AA...-...A...CA...TT...T										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	G...-...-...-...C...T...A...T...G...A...-...T...AA...-...A...CA...TT...T										
Identity	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	-...-...C...-...TTC...G...-...-...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	-...-...C...-...TTC...G...-...-...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
Identity	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	.AT...CA...-...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	.AT...CA...-...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
Identity	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	T...T...T...-...-...T...A...T...G...G...T...T...G...G...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	T...T...T...-...-...T...A...T...G...G...T...T...G...G...T...T...T...T...										
Identity	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	.CTGCT...A...AC...-...TAA...T...CGGCT...G...-...-...T...AC...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	.CTGCT...A...AC...-...TAA...T...CGGCT...G...-...-...T...AC...										
Identity	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190
1. <i>Fenneropenaeus indicus</i> - D-loop	...G...AA...TT...-...T...A...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										
2. <i>Metapenaeus monoceros</i> - D-loop	...G...AA...TT...-...T...A...T...T...T...T...T...T...T...T...T...										

**ANEXO F - REDE DE HAPLÓTIPOS CORRESPONDENTE À REGIÃO DE CONTROLE DLOOP PARA A ESPÉCIE *F. indicus***



As cores representam as áreas geográficas de coleta, assim rosa indica Maputo, verde Sofala, azul Quelimane e amarelo Angoche.

**ANEXO G - REDE DE HAPLÓTIPOS CORRESPONDENTE À REGIÃO DE CONTROLE DLOOP PARA ESPÉCIE *M. monoceros***



As cores representam as áreas geográficas de coleta, assim rosa indica Maputo, e amarelo Angoche.











**ANEXO H – SEQUÊNCIAS DO GENE COI USADAS NA ANÁLISE DE DNA BARCODING (continuação)**

	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450
Consensus	GAATAACTATAGACCGAATAACCACTTTTCGGTTTGAGCAGTATTATTATTACAGCCCTTGCTTAATTACATCTCTACCCAGTTCTAGC										
1. FE_ind_769	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
2. FE_ind_770	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
3. FE_ind_A1	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
4. FE_ind_A2	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
5. FE_ind_A3	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
6. FE_ind_A4	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
7. FE_ind_A5	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
8. FE_ind_A62	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
9. FE_ind_A63	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
10. FE_ind_A64	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
11. FE_ind_M20	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
12. FE_ind_S32	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
13. FE_ind_Z51	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
14. FE_ind_Z52	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
15. FE_ind_Z53	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
16. FE_ind_Z54	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
17. FE_ind_Z55	.....G	.....G	.....G	.....G	.....G	.....A	.....A	.....C	.....T	.....T	.....C
18. MA_jap_751	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
19. MA_jap_763	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
20. MA_jap_764	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
21. MA_jap_A56	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
22. MA_jap_A57	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
23. MA_jap_M1	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
24. MA_jap_M2	.....GT	.....A	.....C	.....C	.....T	.....A	.....C	.....C	.....T	.....T	.....T
25. ME_il_752	.....T	.....A	.....I	.....G	.....I	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C
26. MP_scul_M11	.....G	.....G	.....A	.....C	.....I	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C
27. MP_scul_M12	.....G	.....G	.....A	.....C	.....I	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C
28. MP_scul_S29	.....G	.....G	.....A	.....C	.....I	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C	.....C
29. MT_dob_765	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
30. MT_dob_M1	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
31. MT_dob_M2	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
32. MT_dob_M3	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
33. MT_dob_M4	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
34. MT_dob_M5	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
35. MT_dob_M8	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
36. MT_mo_771	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
37. MT_mo_772	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
38. MT_mo_B1	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
39. MT_mo_B2	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
40. MT_mo_B3	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
41. MT_mo_E1	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
42. MT_mo_E4	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
43. MT_mo_M5	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
44. MT_mo_M71	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
45. MT_mo_M72	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
46. MT_mo_M73	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
47. MT_mo_M74	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
48. MT_mo_S24	.....T	.....G	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
49. MT_mo_S25	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
50. MT_mo_Z40	.....T	.....C	.....A	.....A	.....G	.....C	.....C	.....A	.....G	.....C	.....C
51. MT_steb_755	.....TT	.....A	.....I	.....A	.....G	.....T	.....C	.....T	.....C	.....A	.....I
52. MT_steb_756	.....TT	.....A	.....I	.....A	.....G	.....T	.....C	.....T	.....C	.....A	.....I
53. MT_steb_M76	.....TT	.....A	.....I	.....A	.....G	.....T	.....C	.....T	.....C	.....A	.....I
54. PE_mon_760	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
55. PE_mon_B1	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
56. PE_mon_B2	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
57. PE_mon_M22	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
58. PE_mon_Z41	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
59. PE_mon_Z43	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
60. PE_mon_Z45	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
61. PE_mon_Z54	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
62. PE_mon_A67	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
63. PE_mon_A68	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
64. PE_mon_A69	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
65. PE_mon_M78	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
66. PE_mon_M79	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
67. PE_mon_M80	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T
68. PE_mon_M81	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T	.....T

FE\_ind: *Fenneropenaeus indicus*; MA\_jap: *Marsupenaeus japonicus*; MP\_Scul: *Mierspenaeopsis sculptilis*; MT\_steb: *Metapenaeus stebbingi*; MT\_mon: *Metapenaeus monóceros*; MT\_dob: *Metapenaeus dobsoni*; e PE\_mon: *Penaeus monodon*.