UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Análises morfológicas e moleculares do camarão *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Palaemonidae) ao longo de sua distribuição"

Elis Regina Mesquita

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Análises morfológicas e moleculares do camarão *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Palaemonidae) ao longo de sua distribuição"

Elis Regina Mesquita

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: M.Sc. Naália Rossi
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

Mesquita, E. R.

“Análises morfológicas e moleculares do camarão *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea, Palaemonidae) ao longo de sua distribuição” 40p.

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Orientador: M.Sc. Natália Rossi
Co-orientador: Fernando Luís Medina Mantelatto

1. Divergência genética 2. *Macrobrachium* 3. Inferência bayesiana 4. Máxima verossimilhança 5. Taxonomia

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto, não apenas pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e poder desenvolver este projeto sob sua orientação, mas também por todos os ensinamentos, a atenção, paciência e compreensão que me dirigiu durante todo este período.

Agradeço, também, a doutoranda Natália Rossi, pela co-orientação e auxílio em todos os momentos, pela paciência, compreensão e apoio durante todo o desenvolvimento deste projeto. Pelos ricos ensinamentos que foram cruciais para meu crescimento científico e pessoal. Graças ao seu conhecimento a mim transmitido, pude refletir e aprender muito. Sou imensamente grata por tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da minha bolsa de iniciação científica (processo n° 146729/2014-5), e pelo apoio financeiro concedido ao Prof. Dr. Fernando Mantelatto (processo n° 140199/2011-0), essenciais para a realização dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido ao Prof. Dr. Fernando Mantelatto (processo n° 2010/50188-8), também fundamental para a realização dessa pesquisa.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), por todo apoio logístico.

A Alvaro Costa, Célio Magalhães, Edvanda Souza-Carvalho, Fabrício Carvalho, Flávio Bockmann, Karen Reed, Maria de Lourdes Fonseca, Rafael Lemaitre, Rafael Robles, Sérgio Bueno pela ajuda na obtenção dos animais estudados.

A todos os integrantes e ex-integrantes do LBSC: Bárbara Prado, Juliana Paixão, Ana Luiza Vera, Edvanda Carvalho, Fabrício Carvalho, Tatiana Magalhães, Mariana Negri, Raquel Buranelli, Natália Rossi, Mariana Terossi, Caio de Oliveira, Ana Francisca Gomes, Mateus Lopes, Álvaro Costa, Mayara Yoshiyassu, Silvia Mandai, Carla Khül, Rafael Robles, Leonardo Pileggi, pela agradável convivência e ajuda com as atividades da rotina do laboratório.

A quadragésima nona turma da biologia, especialmente às minhas amigas Carla, Marcela e Wendy, companhias inestimáveis durante toda a graduação.

Aos meus queridos pais, Orlando e Regina, irmãos, Taís e Pedro, e marido, Thiago, agradeço imensamente pelo carinho, atenção e apoio em todos os momentos.

Resumo

Camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* geralmente apresentam grande variabilidade intraespecífica de seus caracteres morfológicos, o que gera dúvidas taxonômicas ao nível específico e erros de identificação são frequentes, como ocorre com *Macrobrachium brasiliense*. Desta forma, espécimes de *M. brasiliense* foram analisados quanto à morfologia externa e a divergência molecular. Adicionou-se algumas espécies congêneres e com maior proximidade filogenética (*M. amazonicum*, *M, borelli*, *M. iheringi*, *M. potiuna* e *M. nattereri*) como grupo externo. Os exemplares analisados são provenientes do acervo da Coleção de Crustáceos do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC) ou de empréstimos de outras coleções carcinológicas. A análise morfológica foi baseada nas características diagnósticas das espécies do grupo, tais como rostro, telso e do segundo par de pereópodos. Foram encontradas muitas variações morfológicas entre os espécimes de uma mesma localidade e caracteres conservados entre os indivíduos das outras espécies estudadas. Entre esses resultados, destaca-se que *M. brasiliense* compartilha muitas características com *M. nattereri*. Contudo, a validade taxonômica de ambas as espécies foram confirmadas. A partir da extração do DNA dos animais, realizou-se a amplificação e o sequenciamento parcial do gene mitocondrial 16S. As sequências disponíveis no GenBank também foram adicionadas às análises. As divergências genética foram estimadas por meio da análise de distância-p. Uma hipótese filogenética baseada no alinhamento de 528 pares de base do gene 16S por máxima verossimilhança e inferência bayesiana foi proposta. A partir das análises moleculares verificou-se uma estruturação genética, evidenciando um taxon críptico com a possibilidade de uma nova espécie de *Macrobrachium*. Além dos valores de distância genética serem maiores que

os intraespecíficos e similares aos comparados com espécies próximas, a existência dessa nova espécie é suportada pelo fato de ser endêmica da bacia do Rio São Francisco. Entretanto novos indivíduos dessa região estão sendo analisados morfologicamente, além da inclusão de sequências do gene COI para confirmação dessa hipótese.

Abstract

In general the prawns of the *Macrobrachium* show a great intraspecific variability of its morphological characters. Because that variations there are some taxonomic doubts at the species level and misidentifications are common in this group, such as *Macrobrachium brasiliense*. The external morphology and molecular divergence of the specimens of *M. brasiliense* were analyzed. We added some congeners (*M. amazonicum, M, borelli, M. iheringi, M. potiuna* and *M. nattereri*) as outgroup. All samples analyzed are from the Laboratory of Bioecology and Crustacean Systematic (LBSC) or they were loaned from other crustacean collections. Morphological analysis was based on the diagnostic features of the species from the group, such as, the rostrum, the telso and the second pair of pereopods. Our findings show many morphological variations among specimens from the same locality and conservative characters between other species. It is emphasized that *M. brasiliense* shares many characteristics with *M. nattereri*. However, the taxonomy validity of both species are confirmed. Since the DNA extraction of these animals, the amplification and partial sequencing of the mitochondrial 16S were done. The sequences available in GenBank were also added to the analysis. Genetic differences were estimated by distance-p. A phylogenetic hypothesis based on the alignment of 528 base pairs of the gene 16S was proposed by maximum likelihood and Bayesian inference. From the molecular analyzes there was a genetic structure and the possibility of a new species of the genus *Macrobrachium*. Apart from the genetic distance values being higher than the intraspecific or similar when compared with close species, the existence of this new species is supported by the fact that it is endemic for the Rio Sao Francisco basin. Therefore new individuals from this region are being analyzed by morphology and new sequences of COI gene will be generate in order to confirm this hypothesis.

Sumário

Resumo.....6

Abstract.....8

1. Introdução.....10

2. Objetivos.....14

3. Materiais e Métodos.....15

3.1 Coleção dos Exemplares.....15

3.2 Dados Morfológicos.....15

3.3 Dados Moleculares.....16

4. Resultados e Discussão.....19

4.1 Análise Morfológica.....19

4.2 Sistemática.....21

4.3 Análise Molecular.....26

5. Conclusão.....34

6. Referências.....35

Introdução

Dentre os crustáceos Decapoda, o gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 representa um importante grupo de camarões da fauna estuarina e dulcícola. Seus integrantes possuem hábitos epígeos, epibentônicos e muitas vezes noturnos, podendo ter um estilo de vida solitário ou de hierarquia nas populações (Short, 2004).

Atualmente, este gênero é composto por 243 espécies distribuídas em águas tropicais e subtropicais de todo o planeta (De Grave & Fransen, 2011), inclusive na América do Sul, nas grandes bacias hidrográficas de Orinoco, Amazônia, Araguaia, Tocantins, São Francisco, Paraná e Paraguai, e em bacias menores do Atlântico Sul (Melo, 2003; Maciel & Valenti, 2009). Além disso, a maior parte dos camarões de água doce com grande importância econômica está inserida neste gênero (Bowles et al., 2000; Murphy & Austin, 2005; Valenti & Tidwell, 2006; Valencia & Campos, 2007).

Como característica marcante do gênero *Macrobrachium*, verifica-se a presença do segundo par de pereópodos com um alto grau de desenvolvimento e variação sexual, chegando até a atingir tamanhos maiores que o do próprio corpo (Pileggi, 2009). Em algumas espécies, observou-se, uma relação entre dominância social e grau desenvolvimento do segundo par de pereópodos, onde os machos dominantes apresentam um maior desenvolvimento dos segundos pereópodos (Short, 2004; Kuris, et al., 1987; Moraes-Riodades & Valente, 2004). As espécies desse gênero se distinguem principalmente por variações no rostro, telso e no segundo par de pereópodos (Holthuis, 1952; Short, 2004; Pileggi, 2009).

Contudo, verifica-se uma grande variabilidade intraespecífica, que muitas vezes está relacionada ao sexo e a idade do animal (Short, 2004), assim como a uma plasticidade fenotípica devida à sua distribuição geográfica fragmentada (Dimmack et al., 2004; Schluter, 2009). Isso, normalmente, dificulta a delimitação taxonômica das espécies desse grupo, além da existência de espécies crípticas ou sinônimas (Murphy et al., 2004; Pileggi, 2009; Rossi & Mantelatto, 2013). Por essa razão, muitas vezes, analisar apenas as características morfológicas não são suficientes para a distinção de muitas destas espécies e pode levar a erros (Holthuis, 1952). Tal condição evidencia a necessidade de utilizar novas ferramentas e aprofundar a investigação onde o status taxonômico é incerto.

No Brasil, sabe-se que ocorrem 17 espécies do gênero (Pileggi & Mantelatto, 2012), entre elas a espécie em estudo, *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862). Sua localidade tipo é no estado do Mato Grosso, Brasil, e os indivíduos dessa espécie encontram-se distribuídos em águas interiores da Venezuela, Colômbia, Guianas, Suriname, Equador, Peru e Brasil, neste último localizado nos estados do Amapá, Acre, Amazonas, Pará, Maranhão, Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Bahia, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, ou seja, nas bacias Amazonas, Atlântico Norte, Tocantins, São Francisco, Atlântico Leste e Paraná (Coelho & Ramos, 1985; Pereira, 1993; Melo, 2003, Pileggi et al., 2013).

Como características reprodutivas, apresenta ovos grandes e em pequena quantidade e seu tempo de incubação é longo, com poucas fases larvais. Além disso, esta é uma das espécies do gênero que não necessita de água salobra em nenhuma fase de seu desenvolvimento (Pileggi, 2009). Segundo Mantelatto & Barbosa (2005), é possível a existência de um padrão atípico em relação às fêmeas ovígeras desta espécie, uma vez que, foram encontradas apenas em número muito reduzido. Aliado a isso, ao

analisar a literatura vigente, foram encontradas poucas publicações que abordavam questões relacionadas a esta espécie, principalmente no que tocante à biologia e comportamento da espécie em questão. Estes dados sugerem a necessidade de maior produção de conhecimento a respeito da temática, visando maior esclarecimento de tais questões pendentes.

Quanto à sua taxonomia, a espécie *M. brasiliense* compartilha muitos caracteres com outras três espécies próximas: *M. nattereri* Heller, 1862; e *M. ferreirai* Kensley & Walker, 1982. De acordo com Nascente & Porto (2007), é possível separar as espécies citadas acima pelo número de dentes na margem superior do rostro (de 8 a 11 dentes no *M. brasiliense*, maior que 9 dentes em *M. ferreirai* e de 11 a 14 no *M. nattereri*), pela carapaça (com muitos espínulos em *M. brasiliense*, lisa em *M. ferrreirai* e áspera em *M. nattereri)* e pelo segundo pereópodos (diferentes padrões de proporções e de distribuição de espinhos, espínulos e cerdas, sendo no *M. brasiliense* sem um padrão típico de distribuição dos espinhos, no *M. ferreirai*, o segundo par de pereópodos bem mais longo que todo o corpo do indivíduo e no *M. nattereri*, presença de um padrão típico de distribuição de espinhos, espínulos e cerdas). Contudo as diferenças são muito sutis e muitas vezes identificar corretamente é impraticável. Por exemplo, no trabalho Nascente & Porto (2007), comparações morfométricas entre *M. brasiliense* e *M. nattereri* foram incapazes de separá-las, gerando questionamentos a respeito da validade destas espécies.

A variabilidade morfológica também pode estar relacionada com o desenvolvimento ontogenético dos indivíduos ou com a dominância social, como já relatado para algumas espécies congenéricas (Short, 2004; Kuris et al., 1987; Moraes-Riodades & Valenti, 2004). Em outros casos as variações intrapopulacionais se referem às plasticidades fenotípicas encontradas em uma distribuição com distintas pressões

seletivas (Dimmack et al., 2004; Schluter, 2009). Portanto, pode-se propor a hipótese de que *M. brasiliense*, devido à sua distribuição fragmentada, apresenta indicativos de divergências entre as populações ou até mesmo a presença de várias espécies, devido à uma possível ausência de fluxo gênico,

Desta forma, são necessárias a verificação da variabilidade morfológica de *M. brasiliense* e a complementação de tais dados com a utilização de outras ferramentas. A biologia molecular aplicada às análises de distância genética e relações filogenéticas tem auxiliado de maneira efetiva na elucidação de dúvidas referentes à sistemática de espécies de *Macrobrachium* (Murphy et al., 2004, Mantelatto et al., 2009; Pileggi & Mantelatto, 2010; Vergamini et al., 2011; Rossi & Mantelatto, 2013; Carvalho et al. 2014).

Dentre as inúmeras possibilidades do uso da técnica molecular, geralmente é escolhido o DNA mitocondrial (mtDNA) para estudos taxonômicos que envolvem diferentes populações. Entre os fatores dessa escolha estão o fato dele ser constituído de um filamento duplo de DNA circular contendo cópias únicas de genes, ser relativamente pequeno, com herança uniparental e alta taxa mutacional quando comparado ao DNA nuclear. Desse modo, pode evidenciar diferentes padrões evolutivos devido às suas diferentes classes de genes, podendo ser utilizado para a verificação de diversos níveis de divergência (Simon et al., 1994; Avise, 2004).

Em específico, o gene 16S rRNA se trata do mais utilizado como base na elaboração de filogenias, devido à sua estrutura genética não codificante que une regiões variáveis e conservadas, permitindo a identificação de relações filogenéticas recentes, além de sua grande diversidade de primers específicos e disponíveis para análises moleculares (Schubart et al., 2000).

Objetivos

- Esclarecer o limite taxonômico do *Macrobrachium brasiliense* e compreender a variabilidade genética ao longo da sua distribuição geográfica por meio de análises de caracteres morfológicos e moleculares dos exemplares de diversas bacias hidrográficas;

- Estimar as divergências genéticas intra e interespecífica; propor uma hipótese filogenética por meio das sequências do gene mitocondrial 16S mtDNA a fim de compreender as relações desta com as demais espécies do gênero, que são intimamente relacionadas.

Material e Métodos

3.1 Coleção dos exemplares

Buscou-se a obtenção de exemplares de *M. brasiliense* ao longo da sua distribuição. Muitos dos espécimes analisados foram obtidos por ocasião de outros projetos do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP) e encontram-se depositados na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB). Outros espécimes foram obtidos por novas coletas, visitas in loco de outras coleções carcinológicas, doação ou empréstimo de coleções científicas, ou coletados e enviados por pesquisadores de diversas instituições. O material obtido por tais vias foi devidamente etiquetado, conservado em álcool etílico 80% e incorporado à CCDB/FFCLRP/USP. Coletas de campo foram realizadas sob o amparo de Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico (nº 11777-1 MMA/IBAMA/SISBIO de 16/09/07) concedida para Fernando Luis Medina Mantelatto, a qual é válida para todo território nacional. Os animais capturados foram igualmente preservados diretamente em álcool etílico 80%, identificados e incorporados na CCDB.

3.2 Dados morfológicos

A identificação dos exemplares foi realizada com base nas características morfológicas diagnósticas da espécie descrita na literatura, tais como características do rostro, carapaça e segundo par de pereópodos (Holthuis, 1952; Melo, 2003; Pileggi, 2009). Os dados morfológicos foram obtidos por meio de estudo comparativo de indivíduos adultos, fêmeas e juvenis com a utilização de estereomicroscópio Leica® acoplado a uma câmera clara. Os animais foram mensurados (comprimento da carapaça)

com paquímetro digital Starrett® 727 (0,01 mm). Em particular, foram analisados os caracteres morfológicos com maior variação: formato e número de dentes do rostro, formato, proporções e ornamentação dos artículos dos pereópodos, além do formato do telso e tamanho de seus espinhos. Além destes buscou-se novos caracteres que possam ser informativos na determinação da espécie e ou separação entre populações. Todos esses caracteres foram reunidos e organizados sob a forma de uma tabela (Tab. 1) que serviu de guia durante a revisão taxonômica. Após revisar os exemplares obtidos até o momento, realizou-se uma análise comparativa dos caracteres, identificando os que apresentaram maior variação entre os indivíduos.

Tabela 1: Caracteres selecionados para a análise morfológica dos exemplares de *Macrobrachium brasiliense*.

Características analisadas	
Rostro	nº total de dentes e nº de dentes localizados atrás da órbita
Carapaça	Lisa ou com espinhos
Segundo par de pereópodos	Comprimento dos dedos em relação à palma, formato da palma (cilíndrica ou achatada), descrição da distribuição dos espinhos da palma e nº de dentes na face cortante do dedo
Telso	Tamanho do espinho interno em relação ao tamanho do telso
Quinta pleura	Formato do final da quinta pleura

nº = número

3.3 Dados Moleculares

O DNA genômico total foi obtido a partir dos tecidos musculares abdominais ou dos pereópodos. Os procedimentos para extração do DNA e amplificação por PCR

(Saki *et al*., 1988) foram baseados no protocolo de Mantelatto *et al*. (2009) com modificações em Pileggi & Mantelatto (2010).

O fragmento do gene 16S foi utilizado devido à sua atuação na distinção de variações específicas em análise filogenéticas previas (Pileggi & Mantelatto, 2010; Rossi & Mantelatto, 2013), o que permite contextualizar a espécie dentro do gênero *Macrobrachium*, além de ser uma combinação de regiões conservadas e variáveis, sendo um gene estrutural que não codifica e é mais conservado. Os seguinte conjunto de primers está sendo usado: H2 (AGA TAG AAA CCA ACC TGG) e L2 (TGC CTG TTT ATC AAA AAC AT) para o fragmento do gene mitocondrial 16S (Crandall & Fitzpatrick Jr., 1996).

Os fragmentos dos genes mitocondriais 16S foram amplificados por meio da técnica de Polymerase Chain Reaction, conhecida como PCR, sendo seus produtos obtidos em reação de 25µL, contendo 6,5 µL de água ultrapura, 5 µL de Betaína 5M, 3 µL de PCR Buffer 10x, 3 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 4 µL de DNTPs, 2 µL de primers (1 µL de cada), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase recombinante (Thermo Scientific®) (5 U/µL) e 1 µL de DNA a 10 ng/µL.

O processo de amplificação ocorreu no termociclador Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler®, com ciclos termais, sendo a desnaturação inicial de 5 min a 95 °C; pareamento por 40 ciclos, de 45 s a 95 °C, 45 s a 52 °C, 1 min a 72 °C; extensão final de 3 min a 72 °C. Após isso, com o produto do PCR, realizou-se eletroforese com gel de agarose 1,5%. Por fim, fotografou-se os resultados com câmara digital C-7070 Olimpus® em um transiluminador UV M20 UVP®. O processo de purificação foi realizado com a utilização do kit SureClean Plus® (Bioline).

O sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador automatizado ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems automated sequencer) no Departamento de Biologia da FFCLRP – USP e no Departamento de Tecnologia da

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV) – UNESP, por meio do kit de reação ABI Big Dye® Terminator Mix (PE Biosystems). As sequências obtidas foram confirmadas pelo sequenciamento de ambas as fitas (senso e antisenso). A edição, o consenso das sequências e as divergências genéticas entre os espécimes foram realizadas no programa BioEdit versão 7.0.9 (Hall, 1999). Foram obtidas e analisadas no presente estudo 32 sequências parciais do gene 16S. Os mesmos procedimentos foram realizados para exemplares de *M. amazonicum*, *M. aracamuni*, *M. borelli*, *M. ferrerai*, *M. iheringi*, *M. potiuna* e *M. nattereri*, porém em outros estudos realizados no LBSC. Tais espécies foram utilizadas no estudo para que fosse possível contextualizar a espécie no gênero como um todo, já que haviam espécies proximamente e distantemente relacionadas a *M. brasiliense* no sentido taxonômico. Sequências de 16S destas espécies estão disponíveis no GenBank e foram utilizadas para propor uma filogenia por máxima verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) (Felsenstein, 1981) e inferência bayesiana (Bayesian Inference – BI) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Deste modo, foram elaborados dendogramas pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) no programa RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2006) na plataforma online CIPRES (Cyberinfrastructure for Philogenetic Research) (Miller *et al.*, 2010) e por inferência Bayesiana (Bayesian Inference - BI) realizado por meio do programa MrBayes v. 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). A análise bayesiana foi configurada para utilizar os seguintes parâmetros: frequência de amostragem igual a 500, quatro cadeias de aquecimento (três aquecidas e uma fria), valor da parada de aquecimento das cadeias menor que 0,01 depois de no mínimo 1.000.000 de gerações. Posteriormente, os dados obtidos foram coletados da fase estacionária da cadeia e os estados iniciais descartados (burnin = 10%). Para a análise dos resultados, utilizou-se o consenso da maioria das

árvores geradas. A consistência interna dos ramos foi avaliada pelo método de "bootstrap" (Felsenstein, 1985) para ML e pelo método de probabilidades posteriores para BI. A árvore consenso gerada foi editada pelo programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

Resultados e Discussão

4.1 Análise Morfológica

Foram analisados 92 indivíduos, de diferentes regiões do país (Pará, Tocantins, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Amapá, Amazonas, Acre, Maranhão, Paraná e São Paulo), oriundos de diversas bacias hidrográficas, e outros países, como Equador e Peru (Tab. 2).

Tabela 2: Exemplares de *Macrobrachium brasiliense*, *M. ferrerai* e *M. nattereri* que já possuíam identificação prévia, a qual foi confirmada, e que foram analisados quanto aos caracteres morfológicos.

Espécie	Local de Coleta	Coleção	Indivíduos
M. brasiliense	BR – 156, furo do Henrique, Amapá, AP – Bacia Amazônica	INPA 1072	2F e 1 M
	Rio Araguari, igarapé na cachoeira da Capivara, Amapá, AP – Bacia Atlântico Norte/Nordeste	INPA 1074	2M e 2F
	Aldeia Balawa-ú, Igarapé Hoanik, Amazonas, AM - Bacia Amazônica	INPA 1336	1M e 3Fov
	Rio Urubu, Presidente Figueiredo, AM - Bacia Amazônica	INPA 124	4M
	Rio Xingu, Volta Grande, PA - Bacia Amazônica	CCDB 4802	3F
	Rio Bacajaí em confluência com Rio Xingu, PA - Bacia Amazônica	CCDB 4814	1F e 3M
	Rio Riachão, MA - Bacia Atlântico Norte/Nordeste	INPA 1434	2M e 1Fov
	Rio Ponte Alta, Ponte Alta, TO - Bacia Tocantins/Araguaia	CCDB 5023	2M
	Estrada Ponte Alta, Mateiros, TO - Bacia Tocantins/Araguaia	CCDB 5171	2M e 1F

	Estrada Ponte Alta, Mateiros, TO - Bacia Tocantins/Araguaia	CCDB 5172	3F
	Rio Ribeirão Bonito, Ribeirão Cascalheira, MT – Bacia Paraná	CCDB 2298	3M
	Rio Corgão, Ribeirão Cascalheira, MT - Bacia Paraná	CCDB 2307	2M e 2F
	Ribeirão Santin, GO - Bacia Tocantins/Araguaia	CCDB 5462	2M
	Rio Preto, próximo ao Rio Cariranha, Chapada Gaúcha, MG – Bacia São Francisco	CCDB 543	3M
	Prainha do Rio Preto, Parna G Sertão Veredas, MG - Bacia São Francisco	CCDB 535	4M
	Rio Preto, Chapada Gaúcha, MG - Bacia São Francisco	CCDB 464	2M
	Córrego do Macaco, Ponte Estrada da Terra MS 324, MS – Bacia Paraná	CCDB 1582	3F
	Rio Sucuri, Fazenda Porteiro do Sucuri, Rio Paraná, MS – Bacia Paraná	CCDB 1564	3F
	Córrego Mutum, Bonito, MS - Bacia Paraná	CCDB 1908	2M
	Rio Miranda, Bonito, MS - Bacia Paraná	CCDB 5440	1Fov e 2M
	Serra Azul, Ribeirão Preto, SP - Bacia Paraná	CCDB 339	1M e 1F
	Rio Araraquara, Cajuru/Altinópolis, SP - Bacia Paraná	CCDB 2898	3F
	Bacia do Rio Turvo com Rio Grande, Guapiaçú, SP - Bacia Paraná	LEEUSP 1	3M
	Rio Paranapanema, SP - Bacia Paraná	LEEUSP 3	3M
	Rio Taquarense, cerca de 2 km de Anastácio/ Aquidauana, Paraná, PR - Bacia Paraná	INPA 487	1M
	Quebrada Paujil, afluente Rio Nanay, Loreto, Peru – Bacia Amazônica	INPA 725	3M
M. ferreirai	Rio Bezerra, Fazenda Goiano, Brasília, DF - Bacia Tocantins/Araguaia	CCDB 5463	3M
M. nattereri	Lago Tupé, Igarapé Central, AM - Bacia Amazônica	CCDB 2130	1M
	Pará, PA - Bacia Amazônica	INPA 1121	2F e 1M

M, machos; F, fêmeas; Fov, ovígera; LEEUSP, Laboratório de Estudo de Eglídeos, Universidade de São Paulo; INPA, Instituto de Pesquisas da Amazônia; CCDB, Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

Figura 1: Delimitação das bacias hidrográficas do Brasil, disponível em: http://escola.britannica.com.br/atlas

4.2 Sistemática

***Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) Figura 2**

Palaemon brasiliense Heller, 1862: 419.

Material examinado: Venezuela - macho (CC 57,00 mm), USNM 233659, data de coleta: 2/i/1952; Colombia - macho (CC 57,98 mm) e fêmea (CC 44,96mm), USNM 78046, data de coleta não disponível; Equador - macho (CC 44,13 mm) e 2 fêmeas (CC 31,97 mm e 34,40 mm), USNM 149812, data de coleta: 00/x/1973; Peru - 3 machos (CC 30,96 - 34,11 mm), INPA 725, data de coleta: 26/vi/1997; macho(CC 50,76 mm),

USNM 228908, data de coleta: 13/ix/1979; macho (CC 36,00 mm), USNM 230034, data de coleta: 10/ii/1980; Brasil - Amapá: macho (CC 37,00 mm) e 2 fêmeas (CC 34,16 mm, 38,80 mm), INPA 1072, data de coleta: 27/viii/1992; 2 machos (CC 30,63 mm, 39,32 mm) e 2 fêmeas (CC 25,71 mm, 29,25 mm), INPA 1074, data de coleta: 20/viii/1992; Amazonas: macho(CC 60,50 mm) e 3 fêmeas ovígeras (CC 46,00 - 49,97 mm), INPA 1336, data de coleta: 07/x/2003, 4 machos (CC 37,20 - 47,98 mm), INPA 124, data de coleta: 11/ix/1982; Pará: 3 fêmeas (CC 13,40 - 17,32 mm), CCDB 4802, data de coleta: 15/ix/2013; fêmea (CC 37,73 mm), CCDB 4814, data de coleta: 16/ix/2013; 3 machos (CC 36,60 - 39,98 mm), CCDB 4814, data de coleta: 16/ix/2013; Maranhão: 2 machos (CC 52,40 mm e 40,93 mm) e fêmea ovígera (CC 36,81 mm), INPA 1434, data de coleta: 07/x/2003; Tocantins: 2 machos (CC 33,69 mm e 36,06 mm), CCDB 5023, data de coleta: 19/v/2013; 2 machos (CC 32,24 mm, 44,71 mm) e fêmea (CC 23,60 mm), CCDB 5171, data de coleta: 19/v/2013; 3 fêmeas (CC 17,38 - 33,57 mm), CCDB 5172, data de coleta: 19/v/2013; Mato Grosso: 3 machos (CC 51,80 - 56,06 mm), CCDB 2298, data de coleta: 09/x/2007; 2 machos (CC 27,00 mm, 49,32 mm) e 2 fêmeas (CC 34,35 mm, 35,50 mm), CCDB 2307, data de coleta: 10/x/2007; Goiás: 2 machos (CC 44,76 mm, 46,20 mm), CCDB 5462, data de coleta: 07/vii/1998; Minas Gerais: 3 machos (CC 32,80 - 37,97 mm), CCDB 543, data de coleta: 13/vii/2011; 4 machos (CC 23,10 - 38,67 mm), CCDB 535, data de coleta: 25/vii/2011; 2 machos (CC 27,46 mm, 31,92 mm), CCDB 464, data de coleta: 13/vii/2011; Mato Grosso do Sul: 3 fêmeas (CC 26,75 - 46,01 mm), CCDB 1582, data de coleta não disponível; 3 fêmeas (29,49 - 38,15 mm), CCDB 1564, data de coleta: 27/vii/2006; 2 machos (CC 30,76 mm, 52,11 mm), CCDB 1908, data de coleta: 01/viii/2006; 2 machos (CC 39,68 mm, 53,21 mm) e fêmea ovígera (CC 46,23 mm), CCDB 5440, 08/11/2014; São Paulo: macho (CC 49,33 mm) e fêmea (CC 32,89 mm), CCDB 339, data de coleta: 01/iv/1996; 3 fêmeas (17,46 - 39,42 mm), CCDB 2898, data de coleta: 28/iv/2009; 3

machos (CC 43,60 - 57,21 mm), LEEUSP 1, data de coleta: 14/vii/2001; 3 machos (CC 44,02 - 57,82 mm), LEEUSP 3, data de coleta: 23/viii/2000; Paraná: macho(CC 53,70 mm), INPA 487, data de coleta: 09/x/1985; Bolívia - fêmea (CC 32,69 mm), USNM 84860, data de coleta: 21/xii/1922; Paraguai - macho(CC 47,85 mm), USNM 353018, data de coleta: 18/v/1982

Descrição: Rostro reto, alcançando além do pedúnculo antenular, não chegando ao fim do escafocerito. Margem superior com 7 a 12 dentes regularmente espaçados, 2 a 4 atrás da órbita, em geral o terceiro sobre a órbita. Primeiro e o segundo dente posicionados com mais espaço que entre os demais dentes do rostro. Margem inferior com 2 a 3 dentes. Carapaça com espínulos e cerdas localizadas anterolateralmente. Margem posterior do telso triangular com dois pares de espinhos. Par interno ultrapassa ou alcança a margem posterior. Quelípodos iguais na forma, mas diferentes no tamanho. Quela maior alcança com todo o carpo além do escafocerito; dedos com metade ou mais da metade do comprimento da palma; palma achatada; dátilo com dois dentes grandes na face cortante, entre eles, geralmente um dente menor ou vários dentes menores; uma linha de 4 a 11 tubérculos na face interna do dedo fixo; palma com espinhos, distribuídos em linhas bem definidas na face superior e inferior; face interna com espinhos, espínulos e cerdas aleatórias na face externa; ísquio mais da metade do comprimento do mero.

Jovens: Possuem a quela mais curta, alcançando além do escafocerito só com parte do carpo, e também a palma é relativamente mais curta.

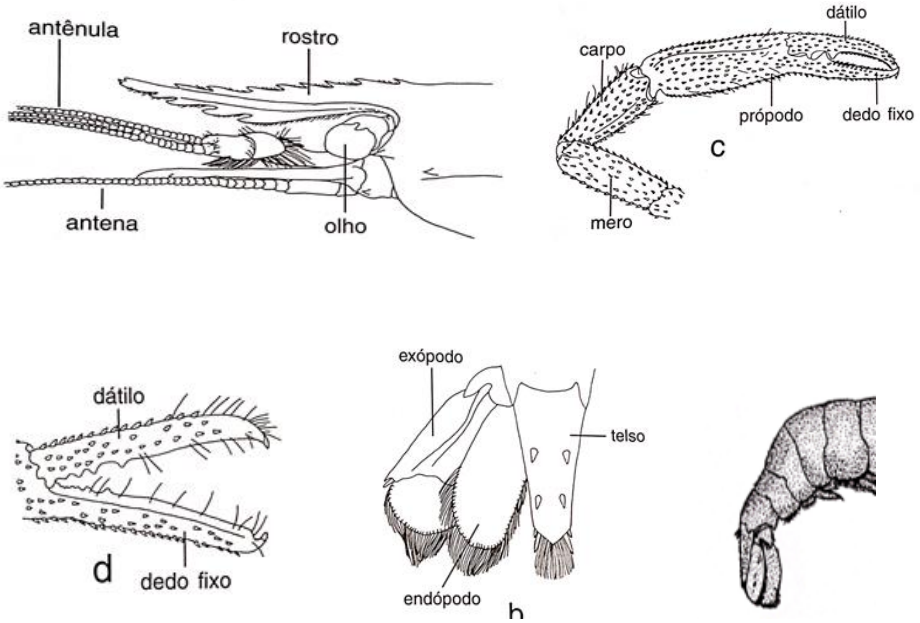


Figura 2. Características morfológicas analisadas, retirado de Melo (2003)

Distribuição: Águas interiores da Venezuela, Colômbia, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Brasil (Acre, Amapá, Pará, Amazonas, Maranhão, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná), Bolívia e Paraguai (registros documentados em Holthuis, 1952, 1959; Rodríguez, 1982; Ramos-Porto & Coelho, 1990; Pereira, 1993; Arraes & Ramos-Porto, 1994; López & Pereira, 1996; Magalhães, 2002; García-Dávila & Magalhães, 2003; Valencia & Campos, 2007; Pileggi *et al*., 2013).

Localidade tipo: Próximo a Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil.

Considerações: A distribuição de *Macrobrachium brasiliense* é ampla no território brasileiro, com registros de ocorrência no Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Tocantins, Paraná, Minas Gerais e

São Paulo. Neste sentido, os exemplares analisados neste estudo constituem em representação significativa e satisfatória das populações da espécie distribuídas em suas bacias hidrográficas brasileiras, não apresentando, apenas, indivíduos da Bacia Atlântico Nordeste e Leste, Atlântico Sudeste e Bacia do Uruguai.

De maneira geral, foram verificadas divergências entre as descrições de Melo (2003), Pileggi (2009) e Pileggi *et al*. (2013) sendo elas a relação entre o tamanho dos espinhos das extremidades do telso, assim como a quantidade de dentes no rostro e a proporção do dátilo em relação ao própodo. No presente estudo, observou-se em todos os exemplares identificados previamente como *Macrobrachium brasiliense* que o número de dentes no rostro dos indivíduos varia de 7 a 12 dentes, sendo 9 o mais frequente (33% dos indivíduos), o número de dentes atrás da órbita varia de 2 a 3, sendo 2 o mais frequente (46%). Além disso, a quantidade de espínulos na carapaça dos indivíduos é muito variável. A palma se apresenta quase sempre achatada (70%) e o comprimento do dátilo em relação à palma é mais da metade de seu tamanho, na maioria (70%). Os espinhos da palma não seguem um padrão muito bem definido, geralmente apresentando fileiras de espinhos bem delimitadas nas faces superior e inferior, face interna com espinhos, espínulos e cerdas aleatórias e face externa com poucas cerdas. Face cortante do dedo com dois dentes grandes e um dente menor entre eles, porém existem também outras variações. Quanto ao telso, verificou-se que quase sempre seus espinhos internos ultrapassam o final do telso (76%). Outro caracter muito mencionado na literatura é referente ao final da 5ª pleura com formato ponti-agudo nesta espécie, entretanto, ao comparar esta característica com indivíduos de outras espécies, tais como *Macrobrachium nattereri* e *Macrobrachium ferreirai*, verificou-se que não havia divergência em relação às espécies e sim era uma característica similar em todos os indivíduos analisados, independente da espécie. Não foi possível observar

um padrão morfológico específico para indivíduos relacionados a uma determinada localidade, o que evidenciou a alta plasticidade como encontradas em espécies congêneres (Short, 2004; Rossi & Mantelatto, 2013; Carvalho *et al*., 2014).

Observou-se que os caracteres diagnósticos de cada espécie são, na maioria das vezes, variáveis e apresentam diferenças sutis, gerando dúvidas na identificação. Como, por exemplo, em alguns casos foram encontrados indivíduos diagnosticados como *M. nattereri* com menos de 11 dentes na margem superior do rostro, sendo que está seria uma característica de *M. brasiliense* e não de *M. nattereri*, que apresentaria sempre mais de 11 dentes no rostro. Além disso, observou-se indivíduos de *M. brasiliense* com os espinhos distais do telso ultrapassando a margem distal, sendo que esta seria uma característica de *M. nattereri*, já que em *M. brasiliense* os espinhos distais do telso apenas alcançam a sua margem distal e nunca a ultrapassam, segundo a literatura. Assim, as características diagnósticas de *M. brasiliense* podem se mostrar muito semelhantes às de indivíduos de *M. nattereri* (Melo, 2003; Pileggi, 2009). Para diferenciá-los, Holthuis (1952) sugeriu utilizar o número de dentes do rostro, que teria o número maior no *M. nattereri*, porém este caráter se mostrou muito variável e inconclusivo, o que nos leva a crer a possibilidade de se tratarem de espécies sinônimas.

Figura 3. *Macrobrachium brasiliense*, vista dorsal macho (CC 56,06 mm) CCDB 2298

4.3 Análise Molecular

A extração do DNA foi realizada de 1 a 3 indivíduos de cada localidade (Tab. 3). Nos casos que a técnica de PCR gerou resultados positivos, foram realizadas purificações, outro PCR e em seguida o sequenciamento. Os consensos foram gerados e alinhados com as sequências retiradas do GenBank . Quando não houve amplificação a técnica foi refeita com uma mudança na temperatura de anelamento.

Alguns exemplares tiveram sua fixação primária em formaldeído e outros permaneceram conservados por longo período no fixador, fatores que provavelmente impediram a amplificação do DNA das amostras destes animais, uma vez que, nessas condições o DNA pode ser degradado (Aznar-Cormano *et al*., 2014). Embora, tenha sido realizado um procedimento de retirada do fixador com o tampão GTE a obtenção de uma amostra de DNA integral não foi possível.

Desse modo, até o momento, fragmentos do gene mitocondrial 16S foram amplificados e sequenciados em 32 exemplares com tais características (Tab. 3). Os testemunhos genéticos (vouchers), dos quais foram obtidas as amostras de tecido para as análises, foram depositados na CCDB/FFCLRP/USP ou devolvidos com uma sinalização para as devidas coleções. Foram adicionadas 16 sequências retiradas do GenBank. O alinhamento das 48 sequências de 16S mtDNA apresentou um total de 528 pares de base.

Tabela 3: Indivíduos utilizados nas análises moleculares de *Macrobrachium brasiliense* com suas respectivas localidades, número de identificação das devidas coleções e número de acesso do GenBank.

Espécime	Localidade	Coleção	Nº Genbank
M. brasiliense SP	Serra Azul, SP	CCDB 2135 -1	HM 352429
1 *M. brasiliense SP*	Serra Azul, SP	CCDB 2135 -2	GU 929446
2 M. brasiliense	Ribeirão Cascalheira, MT	CCDB 2298	*
3 M. brasiliense	Ribeirão Cascalheira, MT	CCDB 2298	*
4 M. brasiliense	Ribeirão Cascalheira, MT	CCDB 2298	*
6 M. brasiliense	Ribeirão Cascalheira, MT	CCDB 2307	*
10 M. brasiliense	Serra Azul, SP	CCDB 339	*
13 M. brasiliense	Ponte Alta, TO	CCDB 5023	*
14 M. brasiliense	Ponte Alta, TO	CCDB 5023	*
15 M. brasiliense	Altinópolis, SP	CCDB 2898	*
22 M. brasiliense	Sertão Veredas, MG	CCDB 535	*
23 M. brasiliense	Sertão Veredas, MG	CCDB 535	*
24 M. brasiliense	Sertão Veredas, MG	CCDB 535	*
28 M. brasiliense	Rio Xingú, PA	CCDB 4802	*
29 M. brasiliense	Rio Xingú, PA	CCDB 4802	*
30 M. brasiliense	Rio Xingú, PA	CCDB 4802	*
31 M. brasiliense	Rio Bacajaí, PA	CCDB 4814	*
32 M. brasiliense	Rio Bacajaí, PA	CCDB 4814	*
33 M. brasiliense	Rio Bacajaí, PA	CCDB 4814	*
38 M. brasiliense	Rio Paranapanema, SP	LEEUSPUSP03	*
39 M. brasiliense	Rio Paranapanema, SP	LEEUSPUSP03	*
40 M. brasiliense	Rio Paranapanema, SP	LEEUSPUSP03	*
60 M. brasiliense	Nova Xavantina, MT	CCDB 2306	*
64 M. brasiliense	Sertão Veredas, MG	CCDB 535	*

65 M. brasiliense	Sertão Veredas, MG	CCDB 535	*
66 M. brasiliense	Sertão Veredas, MG	CCDB 535	*
1M. amazonicum	Santana, AP	CCDB 1965-1	GU 929457
2 M. amazonicum	Santana, AP	CCDB 1965-2	GU 929450
3 M. amazonicum	Santana, AP	CCDB 1965-3	HM 352441
4 M. amazonicum	Santana, AP	CCDB 1965-4	GU 929460
1 M. borellii	Buenos Aires, Argentina	UFRGS 3669	HM 352426
2 M. borellii	Buenos Aires, Argentina	UFRGS 3669	GU 929445
1 M. iheringi	Ponta Grossa, PR	UFRGS 2664	HM 352431
2 M. iheringi	Itatinga, SP	CCDB 2126	HM 352432
1 M. potiuna	Cananéia, SP	CCDB 1092	JX 466943
2 M. potiuna	Bertioga, SP	CCDB 3745	JX 466945
3 M. potiuna	Praia Grande, SP	CCDB 3747	JX 466944
4 M. potiuna	Porto Seguro, BA	CCDB 1161-2	JX 466930
5 M. potiuna	Pariquera-Açú, SP	CCDB 3664	JX 466942
6 M. potiuna	Cananéia, SP	MZUSP 8037	HM 352440
M. nattereri	Lago Tupé, AM	CCDB 2130	HM 352428
M. ferreirai	Manaus, AM	CCDB 2125	HM 352427
M. aracamuri	São Gabriel da Cachoeira, AM	INPA 91	HM 352430

Abreviações e siglas: LEEUSP, Laboratório de Estudo de Eglídeos, Universidade de São Paulo. CCDB, Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.*, Está em processo de submissão ao Genbank. INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. MZUSP, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

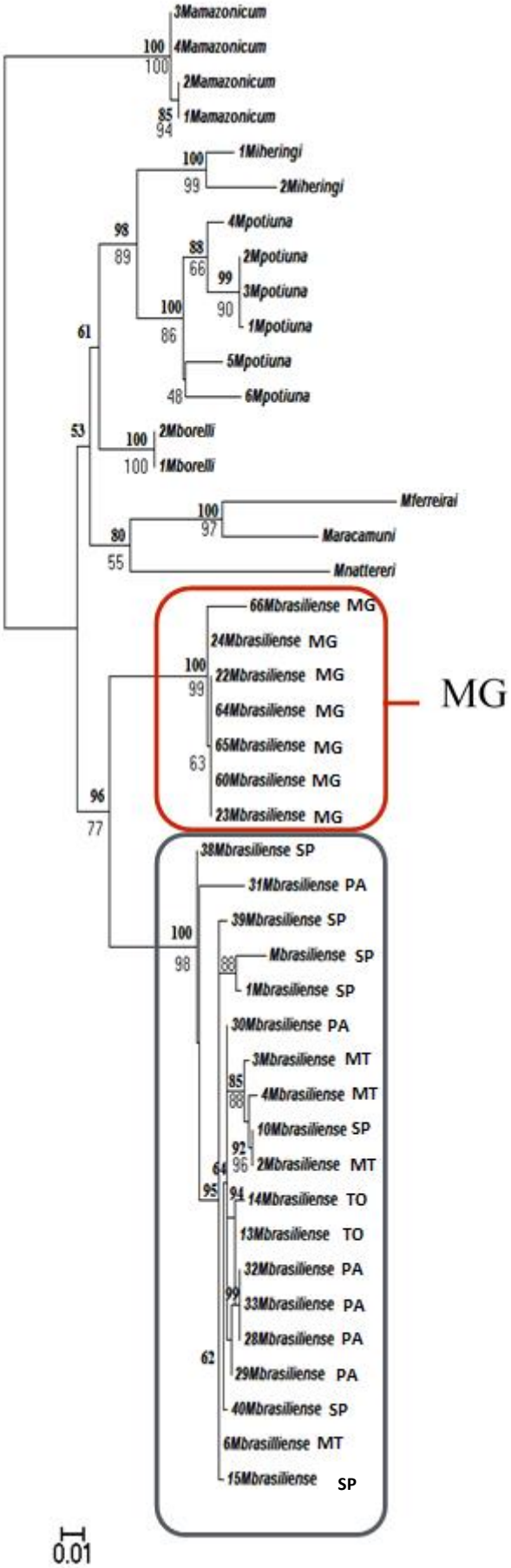
Averiguou-se a variabilidade genética entre as sequências alinhadas por meio de análise de distância no ClustalW (Tab. 4). Com base nos valores interespecífico e intraespecífico, confirmou-se a identificação prévia, constatando a necessidade de se reavaliar os caracteres morfológicos que definem cada uma destas espécies. A divergência genética intraespecífica de *M. brasiliense* variou de 0,0 a 9,3% para 16S e a

interespecífica, de 7,1% a 13,9%. Porém a grande divergência genética entre os indivíduos de *M. brasiliense* refere-se apenas aos indivíduos coletados em Minas Gerais (CCDB 535).

Tabela 4: Distância genética (%) entre indivíduos de *M. brasiliense* e entre espécies congêneres (*M. amazonicum*, *M. aracamuni*, *M. borelli*, *M. ferrerai*, *M. iheringi*, *M. potiuna* e *M. nattereri*).

%	*M. brasiliense*	*M. brasiliense* MG	*M. amazonicum*	*M. aracamuni*	*M. borelli*	*M. ferrerai*	*M. iheringi*	*M. potiuna*	*M. Nattereri*
M. brasiliense	0,0 –2,9	7,2-10,6	11,8-13,6	11,0-13,3	7,2- 9,2	13,5-15,5	8,9-11,4	7,4-10,7	12,2-13,6
M. brasiliense MG	7,2-10,6	0,0-1,93	11,1-13,5	8,8-11,5	7,6- 8,8	13,8-16,2	9,5-12,3	7,3-10,3	10,2-13,2

Figura 3: Dendrograma das espécies de *Macrobrachium* obtido partir gene 16S por Maximum Likelihood, números entre os ramos representam os valores de bootstrap e os em negrito, probabilidades posterior obtidos pela análise de Inferência Bayesiana.


3Mamazonicum
4Mamazonicum
2Mamazonicum
1Mamazonicum
1Miheringi
2Miheringi
4Mpotiuna
2Mpotiuna
3Mpotiuna
1Mpotiuna
5Mpotiuna
6Mpotiuna
2Mborelli
1Mborelli
Mferreirai
Maracamuni
Mnattereri
66Mbrasiliense MG
24Mbrasiliense MG
22Mbrasiliense MG
64Mbrasiliense MG
65Mbrasiliense MG
60Mbrasiliense MG
23Mbrasiliense MG
MG
38Mbrasiliense SP
31Mbrasiliense PA
39Mbrasiliense SP
Mbrasiliense SP
1Mbrasiliense SP
30Mbrasiliense PA
3Mbrasiliense MT
4Mbrasiliense MT
10Mbrasiliense SP
2Mbrasiliense MT
14Mbrasiliense TO
13Mbrasiliense TO
32Mbrasiliense PA
33Mbrasiliense PA
28Mbrasiliense PA
29Mbrasiliense PA
40Mbrasiliense SP
6Mbrasilliense MT
15Mbrasiliense SP
0.01

As topologia de ambas as análises foram similares, portanto colocamos apenas à baseada em ML com os valores de bootstrap. As análises mostraram que *Macrobrachium brasiliense* sensu stricto apresenta uma tendência a estruturação genética, porém sem qualquer relação com a Bacia Geográfica, e houve a formação de um clado separado dos demais, o que foi confirmado pelo alto valor intraespecífico de *M. brasiliense* (9,3%) (Tab. 4). Esses resultados indicam a possibilidade de uma nova espécie, que se caracteriza pelos indivíduos obtidos da Bacia do São Francisco, já que todos os amostrados desta bacia se encontraram em um mesmo clado.

A análise molecular evidenciou a existência de dois grupos, apresentando uma estruturação no clado filogenético. Apesar da não detecção de diferenças morfológicas nos caracteres analisados até o momento, pode ser que existam diferenças em outros caracteres não analisados, como a morfologia interna. Isso nos incita a questionar a existência de uma espécie nova e que poderia ser críptica.

Estudos sobre habitat e modo de vida que demonstrem barreiras ecológicas entre as distintas populações poderiam auxiliar no esclarecimento dos motivos desta divisão da espécie em dois grupos, contribuindo para a delimitação de uma nova espécie e sugerindo um processo especiação (Schluter, 2009).

A alta variabilidade dos caracteres morfológicos encontrados poderia ser uma resposta adaptativa aos diferentes ambientes (Dimmock *et al*., 2004) em que *M. brasiliense* ocorre ao longo de sua distribuição natural. Assim, como *M. australiense* (Dimmock *et al*., 2004), *M. brasiliense* pode ser considerado um colonizador bem sucedido de diversos ambientes por apresentar uma morfologia externa variável que está bem adaptada às diversas condições ambientais.

A partir das análises filogenéticas realizadas com sequências parciais do gene 16S, foi possível inferir que um ancestral originou as diversas populações de *M. brasiliense*, e outro ancestral, por sua vez, deu origem às populações continentais da região Hidrográfica do Rio São Francisco. Análises realizadas com sequências parciais do gene mitocondrial 16S evidenciaram relações filogenéticas informativas para as populações de *M. brasiliense.* Isto foi decorrente da alta variação encontrada entre os indivíduos (taxa de divergência genética entre 0,0 e 9,3%), o que indica que o 16S foi um marcador variável o suficiente para evidenciar uma estruturação ou relação de parentesco entre as populações de *M. brasiliense.*

Este gene é conhecido por ser conservado e apresentar taxa de evolução lenta, ou seja, é um marcador mais preciso para discriminar relações entre espécies do que dentro de espécies. A variação entre as sequências desse gene normalmente é mínima ou nula entre espécimes pertencentes à mesma espécie (Francisco & Galetti Junior, 2005). Assim, o alto índice de variabilidade entre as populações analisadas de *M. brasiliense* com as de Minas Gerais evidencia, a presença de uma distância genica expressiva, o que nos leva a considerar como uma espécie distinta dentro do clado.

Estudos sistemáticos das espécies do gênero *Macrobrachium* (Liu *et al*., 2007; Pileggi & Mantelatto, 2010) estimaram divergências interespecíficas entre 5,5 e 17,5% para 16S. A variação entre populações/indivíduos da mesma espécie, porém de diferentes localidades, variou de 0,0 a 3,2% para 16S. Considerando as taxas de divergência apresentadas no presente estudo, o valor máximo (9,3 %) encontrado nas populações de *M. brasiliense* não se enquadraram dentro da amplitude de variação intraespecífica descrita para o gênero e sim na variação interespecífica. Assim, a variabilidade genética encontrada entre as populações aqui estudadas evidencia uma diferenciação em nível específico. Assim, os dados obtidos neste estudo são

congruentes aos resultados obtidos por Liu et al. (2007), Carvalho *et al*. (2014) e Vera & Silva (2014), que revelaram taxas de divergências bem acima das intraespecíficas, caracterizando a presença de espécies crípticas no gênero *Macrobrachium*, e a delimitação destas foi possível por meio da análise de populações de diferentes localidades.

O surgimento de uma estruturação genética dento do clado pode ter ocorrido devido a um possível isolamento geográfico e, por conseguinte, a falta de fluxo gênico (falta de migração e dispersão) entre as populações existentes nas diversas bacias hidrográficas. No caso específico da população da bacia de São Francisco, que pouco se conecta com com as demais bacias hidrográficas do país, o isolamento e subsequentemente divergência genética ocorre como resultado direto nas populações de espécies de água doce, uma vez que os ambientes terrestres podem representar barreiras intransponíveis, impedindo dispersão e conectividade entre as populações (Carini & Hughes, 2004).

Ressalta-se que o deslocamento em espécies de água doce são muito limitados pela natureza física e disposição dos sistemas fluviais e até mesmo espécies que apresentam grande capacidade de dispersão e podem apresentar níveis de subdivisão populacionais surpreendentemente altos (Carini & Hughes, 2004).

A diversidade genética, expressa dentro e entre populações, pode melhorar a adaptação a um determinado ambiente, e também expandir as fronteiras de colonização e de distribuição, permitindo à espécie sobreviver em uma grande variedade de condições (Leuzzi *et al.*, 2004). Assim, altos valores de variabilidade genética entre populações de uma determinada espécie podem estar relacionados à sua versatilidade ecológica (Leuzzi *et al.*, 2004).

Conclusão

Apesar das variações morfológicas encontradas entre os diferentes espécimes de *Macrobrachium brasiliense* estudados, verificou-se que a distância genética entre eles é menor que entre os valores interespecífico. Confirmou-se a identificação prévia, constatando-se a necessidade de ajustes nos caracteres morfológicos que definem a espécie, bem como aquelas mais próximas. Contudo indivíduos coletados nos afluentes do Rio São Francisco em Minas Gerais apresentaram valores de divergência genética muito maiores que os intraespecíficos e superiores aos encontrados entre espécies proximamente relacionadas. A filogenia baseada no gene 16S revelou a separação de duas espécies. Além disso, constatou-se que apesar da proximidade morfológica com *M. nattereri*, os resultados moleculares mostram uma nítida separação entre elas. Desta forma, verificou-se a ausência de fluxo gênico entre o grupo restrito a bacia do Rio São Francisco e as demais populações de diferentes localidades desta espécie. Faz-se necessário, portanto, aprofundar a análise morfológica com outros exemplares e adicionar outros marcadores genéticos.

Referências

Avise, J.C. (2004). Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA, 684 pp.

Aznar-Cormano, L.; Brisset, J.; Chan, T.Y.; Corbari, L.; Puillandre, N.; Utge, J.; Zbinden, M.; Zuccon, D. & S. Samadi (2014). An improved taxonomic sampling is a necessary but not sufficient condition for resolving inter-families relations in Caridea decapods. Genetics, DOI:10.007/s10709-014-9807-0.

Bowles, D.E.; Aziz, K. & Knight C.L. (2000). *Macrobrachium* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in the Contiguous United States: A Review of the Species and an Assessment of Threats to Their Survival. Journal of Crustacean Biology, 20(1): 158171.

Carvalho, F.L.; Magalhães, C.; Mantelatto, F.L. 2014. Molecular and morphological differentiation between two Miocene-divergent lineages of Amazonian shrimps, with the description of a new species (Decapoda, Palaemonidae, Palaemon). Zookeys, 457 (1): 79-108

Carini, G. & Hughes, M. 2004. Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in Western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes. Heredity, 93: 350-363.

Coelho, P.A. & Ramos-Porto, M. (1985). Camarões de água doce do Brasil: Distribuição geográfica. Revista Brasileira de Zoologia, 2(6): 405-410.

Crandall, K.A. & Fitzpatrick-Junior, J.F. (1996). Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. Systematic Biology, 45: 1-26.

De Francisco, A.K. & Galetti-Junior, P.M. (2005). Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. Genetics and Molecular Biology, 28: 258-261.

De Grave, S. & Fransen, C.H.J.M. (2011). Carideorum catalogus: the recent species of dendrobrachiate, stenopodidean, procaridean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). Zoologische Mededlingen, 85(9): 195-589.

Dimmock, A.; Williamson, I. & Mather, P.B. (2004). The Influence of Environment on the morphology of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae). Aquaculture International, 12(4-5):435-456.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution, 12: 435-456.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39(4): 783-791.

Holthuis, L.B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas II. The subfamilies Palaemonidae. Occasional Paper, Allan Hancock Foundation Publications, 12:1-396.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.

Heller C. 1862. Beiträge zur näheren Kentniss der Macrouren. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien* 45: 389-425.

Kuris, A.M.; Ra'Anan, Z.; Sagi, A. & Cohen, D. (1987). Morphotypic differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Crustacean Biology, 7(2): 219-237.

Leuzzi, M.S.P.; Almeida, F.S.; Orsi, M.L. & L.M.K. Sodré. (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. Genetics and Molecular Biology, 27 (3): 355-362.

Liu, M.Y.; Cai, Y.X. & Tzeng, C.S. (2007). Molecular systematics of the frashwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. Zoological Studies, 46(3):279-289.

Maciel, C.R. & Valenti, W.C. (2009). Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. Nauplius, 17(2):61-79.

Mantelatto, F.L. & Barbosa, L.R. (2005). Population structure and relative growth of freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda, Palaemonidae) from São Paulo State, Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia, 17:245-255.

Mantelatto, F.L.; Pardo, L.M.; Pileggi, L.G. & Felder, D.L. (2009). Taxonomic reexamination of the hermit crab species *Pagurus forceps* and *Pagurus comptus* (Decapoda, Paguridae) by molecular analysis. Zootaxa, 2133: 20-32.

Melo, G.A.S. (2003). Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Melo, G.A.S. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Editora Loyola, pp. 289-415.

Miller, M.A.; Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop, 14: 1-8.

Moraes-Riodades, P.M.C. & Valenti, W.C. (2004). Morphotypes in male Amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. Aquaculture, 236(1-4): 297-307.

Murphy, N.P.; Short, J.W. & Austin, C.M. (2004). Re-examination of the taxonomy of the *Macrobrachium australiense* Holthuis (Decapoda: Palaemonidae) species complex: molecular evidence for a single species. Invertebrate Systematics, 18: 227232.

Murphy, N.P. & C.M. Austin. (2005). Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. Zoologica Scripta, 34 (2): 187-197.

Nascente, M.P.S. & Porto, L.A.C. (2007). Análise morfológica dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) nas principais bacias hidrográficas de Goiás. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

Pereira, G. (1993). A description of a new species of *Macrobrachium* from Peru, and distributional records for *Macrobrachium brasiliense* (Heller) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). Proceedings of Biological Society of Washington, 106(2): 339-345.

Pileggi, L.A.G. (2009). Sistemática filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, pp. 236. Tese (Doutorado).

Pileggi, L.G. & Mantelatto, F.L. (2010). Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. Invertebrate Systematics, 24(1):194-208.

Pileggi, L.G. & Mantelatto, F.L. (2012). Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). Iheringia, Série Zoologia, 102(4): 426-437.

Pileggi, L.G.; Magalhães, C; Bond-Buckup, G. & Mantelatto, F.L. (2013). New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. Revista Mexicana de Biodiversidad, 84: 563-574.

Rambaut, A. (2009) FigTree. Disponível em http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19:1572-1574.

Rossi N. & Mantelatto, F.L. (2013). Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. PLoS ONE, 8(1):e54698.

Schluter, D. (2009). Evidence for ecological speciation and its alternative. Science, 323(5915): 737-741.

Saki, R.; Gelfand, D.H.; Stofell, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491.

Schubart, C.D.; Neigel, J.E. & Felder, D.L. (2000). Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. Crustacean Issues, 12: 817-830.

Short, J.W. (2004). A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). Hydrobiologia, 525(1-3):1-100.

Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H. & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America, 87: 651-702.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics, 22(21): 2688-2690.

Valencia, D.M. & Campos, M.R. (2007). Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. Zootaxa, 1456:1-44.

Valenti, W.C. & Tidwell, J.H. (2006). Economics and Management of Freshwater Prawn Culture in Western Hemisphere. pp. 263-278. In: Leung, S. & C. Engle (Eds). Shrimp Culture: Economics, Market, and Trade. Oxford: Blackwell Science.

Vera e Silva, A.L. (2014). Variabilidade genética e morfológica de *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Crustacea, Palaemonidae) nas bacias hidrográficas brasileiras. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 69p. Monografia de Bacharelado.

Vergamini, F.G.; Pileggi, L.G. & Mantelatto, F.L. (2011). Genetic variability of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). Contributions to Zoology, 80(1): 67-83.