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

Variabilidade genética do camarão de água doce *Atya scabra* (Leach, 1816) ao longo de sua distribuição geográfica (Decapoda, Caridea, Atyidae)

Caio Martins Cruz Alves de Oliveira

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
2014

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

Variabilidade genética do camarão de água doce *Atya scabra* (Leach, 1816) ao longo de sua distribuição geográfica (Decapoda, Caridea, Atyidae)

Caio Martins Cruz Alves de Oliveira

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.

Orientadora: Dra. Mariana Terossi Rodrigues Mariano
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

Ribeirão Preto
2014

Oliveira, C. M. C. A.

“Variabilidade genética do camarão de água doce *Atya scabra* (Leach, 1816) ao longo de sua distribuição geográfica (Decapoda, Caridea, Atyidae)”

Ribeirão Preto, 2014

iv+88p.

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP).

Orientadora: Terossi, M.; Co-orientador: Mantelatto, F.L.

1. Dispersão larval 2. Anfídromo 3. DNA mitocondrial (mtDNA) 4. Taxonomia molecular 5. Biogeografia

Medo das trevas II

"O homem velho está sentado em meio às trevas,
pensando nas suas amantes agora já mortas.
A noite havia caído, tão rápida, um pouco mais a cada dia...
Uma estrela pisca na distância, um outro mundo, tão distante. Será que ainda existe?
Ninguém sabe.
Vemos tão pouco, sabemos tão pouco.
Será que elas ainda me amam? Ou será que viraram poeira, feito as estrelas?
E eu? Virarei anjo ou poeira?
Durante sua vida, buscou por certezas, por respostas aos grandes enigmas.
Primeiro, tentou a fé.
Depois, o conhecimento.
Com o passar do tempo, descobriu que não existem respostas simples, que não existe uma explicação final, coerente.
Entendeu que não existe um plano para a criação.
Lutou contra isso, sem querer aceitar que o que podemos conhecer é limitado, que nunca saberemos tudo.
Sentiu-se pequeno e inútil.
"Se não posso compreender o mundo, quem sou eu?"
Sofreu muito tempo. Não sabia como alcançar a simplicidade do não saber.
Aos poucos as coisas começaram a mudar.
A direção que antes levava a nada virou uma nova estrada.
Era bom não ser parte de um plano para o mundo. Pela primeira vez, o homem velho sentiu-se livre.
Podia sempre continuar a perguntar e a aprender sobre o mundo e sobre si próprio.
Podia sempre amar e esperar que fosse amado.
Estar vivo e ser lembrado é o que importa.
Uma coruja piou na distância.
O homem velho sorriu e pegou o telefone. Para quem ligaria?"

(Marcelo Gleiser, "Criação Imperfeita")

Aos meus pais, por tudo que fazem por mim

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Fernando Luís Medina Mantelatto, por me oferecer a oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório, Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), que ofereceu toda infra-estrutura e financiamentos necessários para a realização deste projeto bem como um ambiente agradável e estimulante. Agradeço ainda por todo esforço dedicado à minha pessoa e ao meu projeto nesse período, todo engajamento, preocupação, oportunidades concedidas, às discussões, aos textos sugeridos de bibliografia, correções e sugestões relativas ao projeto.

Sou imensuravelmente agradecido à minha orientadora Dr. Mariana Terossi Rodrigues Mariano, pela imensa dedicação, esforço, paciência, zelo, preocupação, estímulos e amizade. Seu jeito descontraído e afetuoso com todos é muito especial. Muito obrigado pelos diversos ensinamentos, desde práticos e técnicos às análises de dados e interpretações de resultados. Obrigado pelo otimismo sempre, que era revigorador nas minhas crises. A todas as sugestões, correções, críticas, bibliografia sugerida, e principalmente, pela sua disponibilidade infalível para ajudar sempre!

Sou grato ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) 108611/2012-4 e Pró-Reitoria de Pesquisa - USP pelas bolsas de Iniciação Científica recebidas, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Programa Biota Temático 2010/50188-8 do Prof. Dr. Fernando L. M. Mantelatto e PD 2011/11901-3 concedido à Dra. Mariana Terossi Rodrigues Mariano. Aos projetos que fomentam o LBSC concedidos ao Prof. Dr. Fernando L. M. Mantelatto: CNPq 471011/2011-8 e 302748/2015-5, Coleções Científicas 504322/2012-5, CAPES (Ciências do Mar II Proc. 2005/2014 - 23038.004308/201414).

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

Obrigado aos docentes e funcionários do Departamento de Biologia e da FFCLRP-USP que fizeram parte da minha formação.

Agradeço aos curadores e responsáveis pelas coleções biológicas que permitiram o uso de seus lotes ou pelos empréstimos, todos imprescindíveis à realização deste

trabalho: Charles Fransen (RMNH), Cristiana Serejo (MNRJ), Fernando Alvarez e Jose Luis Villalobos (CNCR), Fernando Mantelatto (CCDB), Ingo Wehrtmann (UCR), Irene Cardoso (MNRJ), Jesser Fidélis (UFPE), Karen von Dorp (RMNH), Laure Corbari (MNHN), Paula Araújo (DZ/UFRGS), Paula Martin-Lefevre (MNHN) e Rafael Lemaitre (USNM).

Muito obrigado a todos que participaram das coletas dos espécimes, bem como aos que realizaram os transportes do material de empréstimos: Alexandre Almeida, Ana Francisca Tamburus Gomes, Fabrício Carvalho, Fernando Mantelatto, Mariana Terossi, Rafael Robles e a equipe do Projeto Piabanha. Agradeço também ao técnico Álvaro da Silva Costa pelo apoio nas coletas e nas atividades no laboratório.

Muito obrigado a todos os membros do LBSC pelo convívio, acolhimento e ajuda nas mais diversas situações.

Obrigado aos colegas da 47ª Turma de Ciências Biológicas por todos os momentos vivenciados ao longo da graduação e aos amigos com os quais eu pude compartilhar moradia ao longo desses anos: Fralda, Gugu, Pink, Fresno e Biscoito.

A minha namorada, Natália, por todo carinho, companheirismo e apoio sempre. Tenho muita sorte em ter você na minha vida.

A toda minha família: em especial minhas tias-avós Wilma e Vera, por todo apoio. E principalmente aos meus pais, José e Rosane, e minha irmã Júlia, pelo amor incondicional.

Sumário

Resumo **1**
Abstract **2**
Introdução **3**
Classificação de *Atya scabra* (Leach, 1816) 3
Atya scabra (Leach, 1816) 5
Ciclo de vida anfídromo 8
Variabilidade genética e taxonomia molecular 10
Objetivo geral **14**
Objetivos específicos **14**
Material e Métodos **15**
Obtenção e identificação dos exemplares 15
Obtenção dos dados genéticos 18
Extração do DNA 18
Amplificação, purificação e sequenciamento dos fragmentos de genes 19
Análises moleculares 22
Resultados **25**
Subunidade ribossomal 16S 25
Citocromo Oxidase I (COI) 30
Discussão **49**
Taxonomia molecular 49
Estruturação genética e dispersão larval 55
Isolamento do Golfo do México 64
Conservação de espécies anfídromas 70
Conclusão **73**
Referências **74**

Resumo

Atya scabra exibe uma distribuição geográfica bastante ampla, ocorrendo na costa oeste da África e no Atlântico Oeste (desde o México até o Brasil). Estudos sobre variabilidade genética contribuem para o conhecimento de como populações de uma mesma espécie estão estruturadas geneticamente, evidenciando possíveis isolamentos geográficos passíveis de ocorrer em longas distâncias e que levariam até mesmo existência de espécies crípticas. A larva desta espécie tem desenvolvimento marinho e poderia sofrer dispersão por longas distâncias carregadas por correntes oceânicas, o que permitiria a manutenção de um fluxo gênico entre as áreas de ocorrência, e, por conseguinte pouca diferenciação genética de populações. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise sobre variabilidade genética de *A. scabra* ao longo de toda sua distribuição geográfica. Os espécimes foram obtidos por meio de coletas e empréstimos de coleções científicas e, os dados genéticos, por meio de protocolos de extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento dos genes mitocondriais 16S e Citocromo Oxidase I. As análises de Maximum-Likelihood, divergência genética e rede de haplótipos corroboraram a validade taxonômica da espécie ao longo de sua distribuição, descartando a possibilidade de existência de alguma espécie críptica. A presença de fluxo gênico contemporâneo ou recente entre longas distâncias, do sudeste brasileiro até o mar do Caribe, é sugerida tendo em vista a existência de haplótipos compartilhados entre essas localidades. Os espécimes analisados da África são geneticamente próximos aos do continente americano, o que sugere dispersão larval pós-separação continental. A formação de um sub-grupo, geneticamente distante das localidades restantes pelos espécimes do México, sugerem a existência histórica ou atual de barreiras zoogeográficas à dispersão larval naquela região.

Abstract

Here, we look over mitochondrial DNA fragments (COI and 16S) from specimens of *Atya scabra*, which covers its great geographical distribution, in order to check the taxonomic status, genetic structure and feasible gene flow among populations of this freshwater shrimp throughout Anfi-Atlantic drainages: in America from northern of Mexico to southern of Brazil, including some Caribbean islands, and in Africa from Cameroon to islands of São Tomé and Príncipe. Specimens were obtained through samples and loans from zoological collections. The genes were amplified by PCR techniques and sequenced following ordinaries protocols. The analyses (Maximum-Likelihood, genetic divergence and haplotype network) showed no intraspecific variation supporting speciation process, therefore the taxonomic status of *A. scabra* through its long distribution was validated. Nevertheless, the analyzes pointed a genetic structure that separated Mexico from the other localities (Caribbean Islands, Africa and Brazil), such divergence may be occurring because of zoogeographical barriers of some kind isolating the Gulf of Mexico. In spite of that spotted structure, the Africa localities showed little distance from de American haplotypes, moreover, shared haplotypes among Brazilian and Caribbean localities lead to believe in recent colonization or gene flow maintenance jointly these localities. Although *A. scabra* adults forms are freshwater exclusive, its larvae development takes place in estuarine/marine environments, allowing marine dispersal by mean of marine currents, which might be restraining a substantial genetic divergence, hence speciation process.

Introdução

Classificação de Atya scabra (Leach, 1816)

A ordem Decapoda Latreille, 1802 é compreendida pelos crustáceos mais conhecidos, estudados e comercialmente explorados. Seus representantes, camarões, lagostas, siris, caranguejos e ermitões apresentam grande diversidade ecológica, morfológica e taxonômica, somando perto de 17 mil espécies descritas (MCLAUGHLIN, 1980; MARTIN & DAVIS, 2001; BRACKEN *et al.*, 2009a; DE GRAVE *et al.*, 2009).

Estudos morfológicos e moleculares suportam uma dicotomia da ordem Decapoda em duas subordens: Dendrobranchiata Bate, 1888 e Pleocyemata Burkenroad, 1963 (DE GRAVE *et al.*, 2009). Essa última contém os representantes da infraordem Caridea Dana, 1852, o grupo mais especioso de camarões, que compreende um total de 3.438 espécies (DE GRAVE & FRANSEN, 2011). Os camarões carídeos exibem grande pluralidade ecológica, habitam ambientes marinhos, de água doce e de água salobra, e estão mundialmente distribuídos (MCLAUGHLIN, 1980; BAUER, 2004). A expansão lateral da pleura do segundo segmento abdominal, que recobre lateralmente o primeiro e terceiro somitos e o terceiro par de pereópodes não quelado, é diagnóstica do grupo, e são utilizados na identificação de seus representantes (HOLTHUIS, 1955; CHACE, 1972; MCLAUGHLIN, 1980; FELGENHAUER & ABELE, 1983; BAUER, 2004).

Os 469 camarões de água doce da família Atyidae De Haan, 1849 são encontrados em riachos, lagos e águas subterrâneas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, mas podem ser encontrados quase no mundo todo, com exceção da Antártica (FRYER, 1977; DE GRAVE & FRANSEN, 2011; VON RINTELEN *et al.*,

2012). Os camarões atyídeos podem ser notoriamente identificados por meio dos dois primeiros pares de pereópodes modificados, os quais apresentam quelas com um conspícuo tufo de cerdas semelhantes a escovas, uma característica que reflete o hábito especializado de filtrar a água ou de raspar o substrato rochoso em busca de alimento (CHACE, 1972, 1992; VILLALOBOS & ÁLVAREZ, 1997).

Os maiores, e possivelmente mais conspícuos camarões atyídeos, são os representantes do gênero *Atya* Leach, 1816, o qual é composto por 13 espécies restritas aos continentes americano e africano (HOBBS & HART, 1982; DE GRAVE & FRANSEN, 2011). Morfologicamente o gênero *Atya* pode ser discernido dos demais Atyidae por: (1) carpo do segundo pereópode mais longo do que largo, em forma de meia lua (escavado anteriormente); (2) ausência de dentes na margem dorsal do rostro; e (3) ausência de exopoditos nos pereópodes (VILLALOBOS, 1943; HOLTHUIS, 1955; CHACE, 1972; HOBBS & HART, 1982; VILLALOBOS & ÁLVAREZ, 1997).

O primeiro registro de um espécime de *Atya* foi realizado por MARCGRAVE (1648), que fez uma breve descrição e uma ilustração de um “Guaricuru” coletado no Brasil. Contudo, a primeira descrição de um espécime do gênero *Atya* foi feita mais de 150 anos depois por LEACH (1815), que descreveu um camarão de localidade desconhecida e cunhou o nome *Atys scaber*, entretanto, um ano depois mudou o nome da espécie (que já havia sido utilizado anteriormente na descrição de um gastrópode) para *Atya scabra* (LEACH, 1816; HOBBS & HART, 1982). Não existe um conhecimento preciso a respeito do destino do material tipo da espécie, entretanto devido às evidências de que a origem geográfica desse espécime seria algum lugar do estado de Veracruz, no México, HOBBS & HART (1982) designaram um neótipo dessa localidade para a espécie, o qual se encontra depositado no British Museum (Londres, Reino Unido).

Atya scabra (Leach, 1816)

Atya scabra (Figura 1) é um camarão de água doce encontrado principalmente em rios e riachos de regiões litorâneas, habita ambientes de água rasa e de correnteza forte, vivendo entre e debaixo de rochas ou vegetação com raízes no substrato (DARNEL, 1956; VILLALOBOS & ÁLVAREZ, 1997; GALVÃO & BUENO, 2000). O tamanho corporal pronunciado e os pereópodes com tubérculos escamosos e espinhos, favorecem a permanência dos indivíduos em ambientes com fluxo de água forte, nos quais eles se fixam ao substrato rochoso e se alimentam sem serem carregados pela correnteza (FRYER, 1977; VILLALOBOS & ÁLVAREZ, 1997).

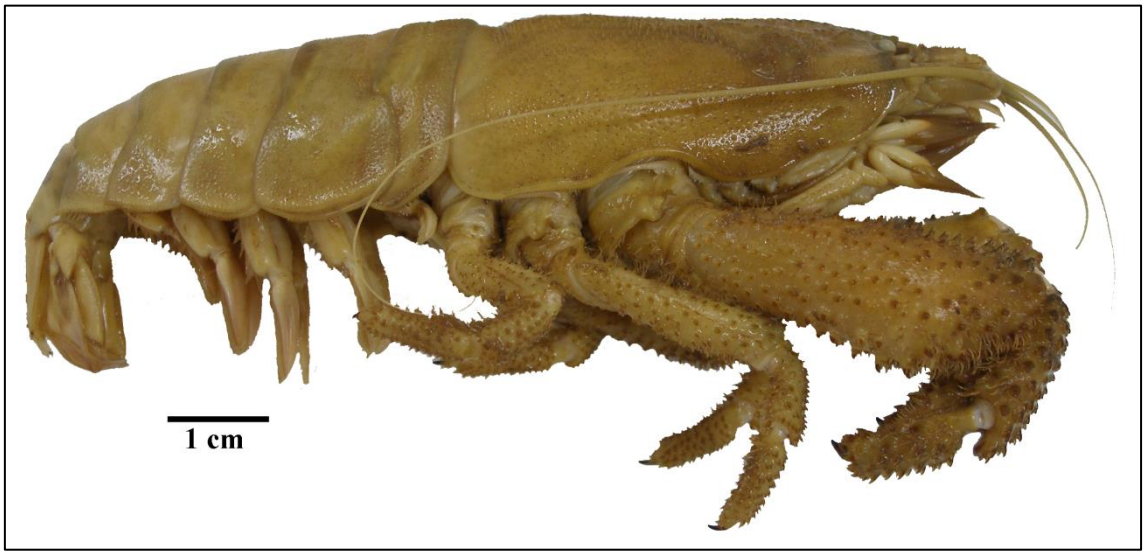

Figura 1: *Atya scabra* (Leach, 1816). Indivíduo macho, São Fidélis - Rio de Janeiro (Brasil), CCDB 5257.

Por conta do tamanho corporal avantajado, relativa facilidade de captura e abundância em determinados corpos d'água, esse camarão tem sido comercialmente explorado e servido como alimento para populações ribeirinhas de diversas regiões (HOLTHUIS, 1980), como no nordeste do Brasil, Jamaica, Porto Rico, Venezuela, México e África (OLIVEIRA, 1945; VILLALOBOS, 1943; HOBBS & HART, 1982; CRUZ-SOLTERO & ALSTON, 1992; LORÁN-NÚÑEZ *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*,

2010), e também comercializada devido ao interesse ornamental no aquarismo (DE GRAVE *et al.*, 2008). A espécie tem como forte ameaça, além da captura para consumo e aquarismo, a degradação do hábitat na construção de barragens, poluição dos rios e estuários, destruição da vegetação marginal dos rios, entre outros fatores da pressão antrópica. Por esses motivos, no Brasil, *A. scabra* já foi considerada ameaçada de extinção em médio prazo, sob a categoria "Vulnerável" (AMARAL *et al.*, 2008), e recentemente reclassificada como Dados Deficientes (F. MANTELATTO com. pes.). Porém em outros países da América do Norte e Central, foi classificada como Preocupação Menor devido a sua ampla distribuição geográfica (F. MANTELATTO E S. DE GRAVE, com. pes.).

A distribuição geográfica de *A. scabra* é bastante ampla (Figura 2), abrangendo regiões tropicais e subtropicais: é encontrada na costa oeste da África (Atlântico Leste), desde a Libéria até o norte da Angola, incluindo Ilhas de Cabo Verde e Annobón, e na vertente leste da América (Atlântico Oeste), desde o Estado de Taumalipas (México) até o Brasil (Rio Grande do Sul), incluindo países insulares na América Central, como Dominica, Jamaica, Cuba, Curaçao, República Dominicana e Ilhas das Índias Ocidentais (HOBBS & HART, 1982; MELO, 2003).

Apesar da variabilidade morfológica encontrada, HOBBS & HART (1982) consideraram os indivíduos analisados ao longo da distribuição citada pertencente a uma espécie única, de *status* taxonômico válido e sinonimizaram os espécimes descritos para diferentes localidades sob nomes distintos (*Atya mexicana* Wiegmann, 1836; *Atya punctata* Kingsley, 1878; *Atya sulcatipes* Newport, 1847 e *Atya margaritacea clavipes* Holthuis, 1966), como pertencente a *A. scabra*. Desde então, a discriminação dos indivíduos da espécie em relação às espécies cogenéricas mais semelhantes tem sido realizada, principalmente, com base no terceiro par de pereópodes, que é mais largo e

robusto do que os demais (OLIVEIRA, 1945; CHACE & HOBBS, 1969; HOBBS & HART, 1982). Na superfície flexora do própodo desse par de apêndices, é possível notar tubérculos (proeminências escamiformes) arranjados em fileiras, que podem estar dispostos de forma contígua, sub-contígua ou mais espaçadas (VILLALOBOS, 1943; HOBBS & HART, 1982).

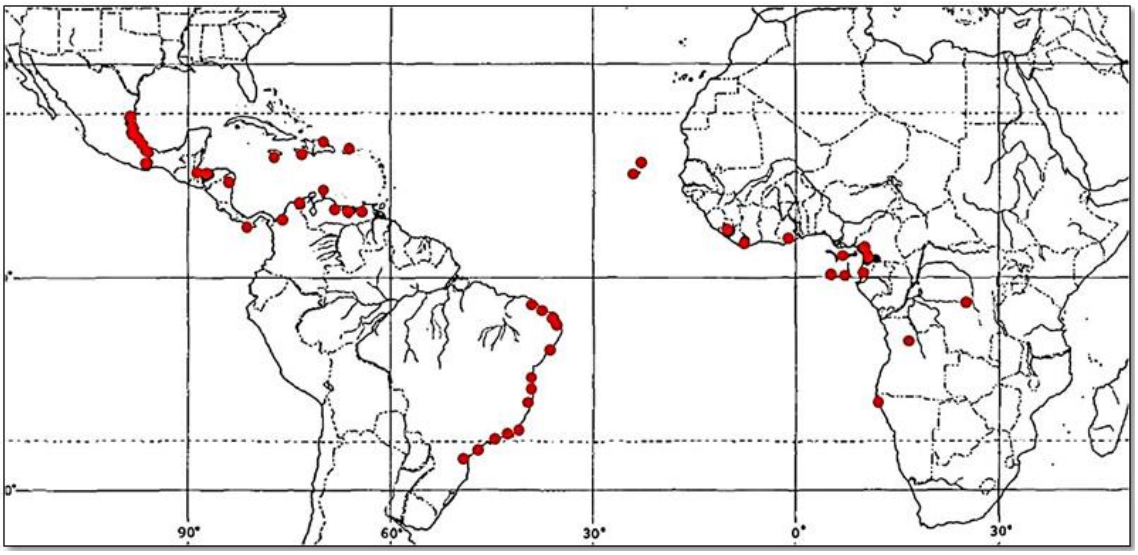

Figura 2: Distribuição geográfica de *Atya scabra* (Leach, 1816): pontos vermelhos representam as áreas de registro na literatura. Modificado de HOBBS & HART (1982).

Embora também variáveis, outras características podem conjuntamente auxiliar na distinção de *A. scabra* dos demais representantes do gênero *Atya*: (1) as margens ventrais das pleuras do segundo somito abdominal, que frequentemente são armadas com uma fileira de dentículos esclerotizados córneos; (2) o rostro, que geralmente exibe lóbulos laterias anteriormente dirigidos, que formam um ângulo agudo com a carena mediana; (3) a carapaça, que comumente apresenta superfície rugosa e esculturada na região cefalolateral e (4) o esterno do quinto seguimento abdominal, que apresenta uma proeminência mediana achatada e dirigida ventralmente (VILLALOBOS, 1943; HOBBS & HART, 1982). Dessa forma, apesar da variabilidade morfológica notória, da distribuição anfi-atlântica e latitudinalmente extensa e vida majoritariamente dulcícola,

o *status* taxonômico da espécie não foi revisado, questionado ou mais profundamente estudado desde então.

Ciclo de vida anfídromo

O abdômen das fêmeas de *A. scabra* geralmente é mais longo, pois o segundo segmento abdominal é maior proporcionalmente em fêmeas do que em machos, o que representa uma característica sexual secundaria que pode aumentar a área de incubação dos ovos (ALMEIDA *et al.*, 2010). Em *A. scabra*, assim como nos demais camarões carídeos, os ovos ficam retidos nos pleópodes abaixo do abdômen até a eclosão das larvas (DARNEL, 1956; BAUER, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2010).

A larva recém-eclodida é carregada pelo fluxo de água dos rios ou córregos em direção à água salobra estuarina/marinha, onde ocorre o restante do desenvolvimento larval. Posteriormente, o indivíduo juvenil migra ativamente em direção à cabeceira de rios ou riachos, onde viverá sua a fase adulta (DARNEL, 1956; ABRUNHOSA & MOURA, 1988; GALVÃO & BUENO, 2000; BENSTEAD *et al.*, 2000). Tal história de vida em que o animal passa a maior parte da vida (estágio adulto) e se reproduz em água doce, porém libera a larva planctônica que necessita de ambientes marinhos ou estuarinos para completar o desenvolvimento, consiste em um tipo particular de diadromia, chamado de ciclo de vida anfidrômico ou anfídromo (MCDOWAL, 2007; BAUER, 2013).

Claramente, essa troca de ambientes pelos indivíduos ao longo da vida denota uma grande relevância ecológica, pois a larva em desenvolvimento marinho e o retorno do juvenil aos córregos são significativos transferidores de energia entre ambientes marinhos e dulcícolas (BAUER, 2011a). Durante as migrações, os indivíduos em diferentes fases da vida tornam-se componentes de distintos ecossistemas, participando

nas modificações de hábitat, na produtividade, relações tróficas, etc. (BAUER, 2011a; 2013).

A anfidromia é tida como favorável à dispersão geográfica, pois devido a ela, a larva tem acesso à ambientes marinhos, nos quais a presença de correntes oceânicas pode propiciar novas colonizações e/ou manutenção de fluxo gênico (COOK *et al.*, 2009, 2012; CRANDALL *et al.*, 2010; TSUKAGOSHI *et al.*, 2011). Pesquisas realizadas em diferentes localidades têm demonstrado que larvas de animais anfídromos utilizam o ambiente marinho como meio facilitador de dispersão entre sistemas de água doce adjacentes e até a centenas de quilômetros de distância (PAGE *et al*., 2005; 2007; 2008; 2013; COOK *et al*., 2009; 2010; 2012; CRANDALL *et al.*, 2010; DENNENMOSER *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 2012).

Estudos realizados com *A. scabra* no Caribe expuseram ausência de estruturação genética entre diferentes localidades: entre rios de uma mesma ilha (Porto Rico) (COOK *et al*., 2009) e entre localidades distantes (Panamá, Porto Rico e Trinidade e Tobago) (COOK *et al*., 2012; PAGE *et al.*, 2013), sugerindo que a capacidade dispersiva da espécie perpetua o fluxo gênico ou possibilita re-colonizações, mantendo uma homogeneidade da espécie devido ao ciclo de vida anfídromo (BAUER, 2013). Entretanto, nenhum estudo prévio analisou tal variabilidade ao longo de toda extensão de ocorrência de *A. scabra*, principalmente com a inclusão de espécimes de diferentes localidades do Brasil, México ou África, que estão centenas de quilômetros distantes.

Isto posto, a inclusão de localidades muito distantes ou de extremos da ocorrência de uma espécie pode evidenciar estruturação genética não existente nas localidades mais próximas ou centrais da distribuição, pois a migração larval pode estar restrita às áreas adjacentes (DENNENMOSER *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 2012).

Distâncias maiores podem não ser transpostas devido a diversos fatores geográficos que atuariam como barreira ao fluxo gênico e levariam a uma possível estruturação populacional (TSUKAGOSHI *et al.*, 2011; KAWANE *et al.*, 2012; WEESE *et al.*, 2012).

De fato, nenhum estudo testou anteriormente a conexão entre populações de uma mesma espécie anfídroma de tão ampla distribuição, tanto latitudinal (norte do México ao sul do Brasil) como longitudinal (anfi-Atlântica). A presença ou ausência de dispersão entre as populações de uma espécie anfídroma com uma ampla distribuição afetará sua estruturação genética (BAUER, 2013) e isso pode ser analisado por meio de estudos sobre variabilidade genética.

Variabilidade genética e taxonomia molecular

Estudos sobre variação genética podem auxiliar a diagnosticar presença ou ausência desse tipo de dispersão larval de maneira indireta (SLATKIN, 1985a; 1987; ROBERTS, 1997), pois por meio das análises populacionais realizadas com os dados moleculares obtidos, é possível inferir a existência de fluxo gênico entre populações em diferentes escalas de distância geográfica por meio da estruturação genética dessas (BENZIE, 1998). Como a formação de uma espécie pode ser identificada com a interrupção do fluxo gênico, evolução de mecanismos de isolamento reprodutivo e acúmulo de diferenças morfológicas e comportamentais (SLATKIN, 1987), a inferência da proximidade genética de populações bem como do fluxo gênico podem ser uma ferramenta eficaz para descobrir espécies distintas (NEGRI *et al.*, 2012; TOURINHO *et al.*, 2012).

A existência ou não de fluxo gênico pode determinar o potencial para a diferenciação genética de uma espécie, pois conjuntos de indivíduos dispersos de forma

alopátrica podem produzir unidades evolutivas distintas e assim apresentar divergência molecular em diferentes níveis (SLATKIN, 1985a; 1987; AVISE *et al.*, 1987). A partir de estudos sobre variabilidade genética é possível discutir a amplitude geográfica de distribuição de uma espécie (VERGAMINI *et al.*, 2011; ROSSI & MANTELATTO, 2013), evidenciar grupos genéticos distintos (SANTOS *et al.*, 2003; HAJIBABAEI *et al.*, 2007), inferir sobre fluxo gênico (SLATKIN, 1985a; 1987), testar a validade taxonômica desta (MCLAY *et al.*, 2011; TOURINHO *et al.*, 2012) e auxiliar no planejamento de estratégias para conservação (SCHUBART & HUBER, 2006; WEESE *et al.*, 2012).

Devido às grandes distâncias de ocorrência de *A. scabra*, tendo em vista que na ausência de dispersões recentes as populações também estariam distantes no tempo, algum nível de isolamento populacional é passível de existir (SLATKIN, 1987) e, portanto, poderia haver desde estruturação genética até a existência de espécies crípticas ao longo da distribuição (BENZIE, 1998).

Marcadores mitocondriais têm sido bastante usados para estudos sobre variação genética com crustáceos decápodes (SCHUBART & HUBER, 2006; VERGAMINI *et al.*, 2011; TEROSSI & MANTELATTO, 2012; WEESE *et al.*, 2012; ROSSI & MANTELATTO, 2013), pois a adição de técnicas moleculares aos estudos tradicionais morfológicos tem o potencial de complementar as identificações prévias realizadas por meio de outras abordagens e realizar confirmações taxonômicas (HILLIS, 1987; HOŁYŃSKI, 2010).

Tendo em vista que dados moleculares têm a capacidade de identificar possíveis divergências genéticas entre populações que poderiam ter evoluído disjuntamente e formado espécies diferentes (BENZIE, 1998), mesmo que diferenças morfológicas

sejam pouco visíveis ou quase ausentes (SANTOS *et al.*, 2003; 2006; BICKFORD *et al.*, 2006; ADAMS *et al.*, 2009), o uso de técnicas moleculares pode ser notoriamente eficiente em casos de espécies crípticas, que muitas vezes pela morfologia similar são classificadas sob o mesmo nome (KNOWLTON, 1986; BICKFORD *et al.*, 2006).

Devido à capacidade dos marcadores de variação rápida como COI, é possível distinguir grupos que morfologicamente ainda não haviam sido notados (HILLIS, 1987), ou os quais a variabilidade morfológica havia sido ignorada ou considerada inconclusiva (TOURINHO *et al.*, 2012) e até mesmo não encontrada (GUSMÃO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Pelo fato de a especiação nem sempre ser acompanhada por diferenciação morfológica, o emprego de técnicas moleculares tem contribuído em evidenciar espécies distintas crípticas de crustáceos, antes classificadas sob o mesmo nível taxonômico (BICKFORD *et al.*, 2006; COOK *et al.*, 2006; PUILLANDRE *et al.*, 2011; NEGRI *et al.*, 2012; TOURINHO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013). Uma correta identificação e descrição das espécies crípticas apresentam aplicações relevantes não só no conhecimento da biodiversidade, mas também na conservação dos organismos envolvidos (BICKFORD *et al.*, 2006).

O emprego da técnica do *DNA barcoding* utiliza fundamentalmente um trecho específico do gene COI, e tem ajudado na identificação de espécies com difícil diagnose morfológica (PUILLANDRE, 2011; NEGRI *et al.*, 2012). Essa famigerada técnica molecular têm se mostrado de grande utilidade para a melhor resolução de problemas taxonômicos, e pode ser considerada uma ferramenta adicional de identificação molecular com êxito significativo (COSTA *et al.*, 2007; PUILLANDRE, 2011; OCAMPO *et al.*, 2013).

Toda essa possibilidade que o uso de dados moleculares exibe, revela o grande potencial que estudos sobre variação genética como este têm em colaborar para a

elucidação de questões pertinentes para a taxonomia, biogeografia e genética de populações de crustáceos. Mais especificamente, haja vista a variação morfológica e ampla distribuição de *A. scabra*, a hipótese deste trabalho é de que existam mais de uma espécie descrita e classificada sob o mesmo nome e que, apesar da capacidade dispersiva anfídroma de homogeneizar divergências entre algumas localidades, essa não seria capaz de impedir processos especiativos ao longo de toda a distribuição conhecida para a espécie em questão.

Objetivo geral

- Estudar a variabilidade genética do camarão de água doce *A. scabra* ao longo de sua ampla distribuição geográfica, testando-se a hipótese da existência de espécies crípticas ao longo da distribuição analisada.

Objetivos específicos

- Testar a validade taxonômica da espécie por meio de técnicas moleculares (genes mitocondriais Citocromo Oxidase I e subunidade ribossomal 16S);
- Diagnosticar o padrão de estruturação genética entre as diferentes localidades de ocorrência da espécie;
- Inferir presença ou ausência de fluxo gênico entre localidades;
- Discutir a taxonomia, distribuição, biogeografia e conservação da espécie.

Material e Métodos

Obtenção e identificação dos exemplares

Parte dos espécimes de *A. scabra* analisados pertence à Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB), da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLRP - USP). Os animais depositados na CCDB foram obtidos por meio de coletas ativas em cursos d'água de regiões costeiras, revolvendo o substrato rochoso, ou com vegetação, por meio de peneiras e puçás e, posteriormente, fixados em álcool 80%.

Os demais exemplares foram obtidos em coleções zoológicas nacionais e internacionais por meio de empréstimos de espécimes ou doação de amostras do tecido abdominal (Tabela I, Figura 3): Coleção Carcinológica do Museu de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil; Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Rio de Janeiro, Brasil; Coleção de Crustáceos do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DZ/UFRGS), Porto Alegre, Brasil; Rijksmuseum van Natuurlijke Historie (RMNH) Leiden, Holanda; Muséum national d'histoire naturelle (MNHN), Paris, França; Smithsonian National Museum of Natural History (USNM), Washington, Estados Unidos; Colección Nacional de Crustáceos (CNCR), Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Cidade do México, México e Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica.

Tabela I: Espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) cujas sequências foram obtidas. A primeira coluna se refere aos números utilizados na Figura 3. SEQ: número de sequências obtidas para os genes COI (Citocromo Oxidase I) e 16S. UFPE: Coleção Carcinológica do Museu de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco; MNRJ: Museu Nacional do Rio de Janeiro; CCDB: Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; DZ/UFRGS: Coleção de Crustáceos do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; RMNH: Rijksmuseum van Natuurlijke Historie; MNHN: Muséum national d'histoire naturelle; USNM: Smithsonian National Museum of Natural History; CNCR: Colección Nacional de Crustáceos e UCR: Universidad de Costa Rica.

	Localidade	Nº Lote	SEQ/COI	nº Acesso GenBank	SEQ/16S	nº Acesso GenBank
1	Arroyo Seco, Querétaro, México	CNCR 25131	1	KM670994	1	KM670936
2	Huehuetla, Puebla, México	CNCR 5808	3	KM670995 - KM670997	1	KM670937
3	Huimanguillo, Tabasco, México	CNCR 17248	3	KM670998 - KM670100	1	KM670935
4	Saint Catherine, Jamaica	RMNH 17870, USNM 1182888	2	KM670987 - KM670988	1	KM670930
5	Costa Rica, Pacífico	UCR 2521	1	KM670985	1	KM670932
6	Reserva Veragua, Limón, Costa Rica	CCDB 4380, 4381, 4385	6	KM670979 - KM670984	0	-
7	Bocas del Toro, Isla Colón, Panama	CCDB 2846	1	KM670986	1	KM670931
8	Limbe, Camarões	MNHN-IU-2009-3974, RMNH 40151 e 45557	3	KM670989 - KM670991	1	KM670933
9	Kribi, Camarões	RMNH 45558	1	KM670992	1	KM670934
10	São Tomé e Príncipe	RMNH 18285	1	KM670993	0	-
11	Pernambuco	UFPE 1780	1	KM670978	0	-
12	Maraú, Bahia, Brasil	CCDB 4522	5	KM670973 - KM670977	1	KM670928
13	Itacaré, Bahia, Brasil	CCDB 1222, 1567, 2630	6	KM670962 - KM670967	1	KM670927
14	Ilhéus, Bahia, Brasil	CCDB 4521	5	KM670968 - KM670972	1	KM670929
15	Viana, Espírito Santo, Brasil	DZ/UFRGS 4593	1	KM670961	0	-
16	Guarapari, Espírito Santo, Brasil	CCDB 2840	1	KM670960	1	KM670926
17	Aperibé, Rio de Janeiro, Brasil	CCDB 5254	4	KM670956 - KM670959	1	KM670922
18	São Fidélis, Rio de Janeiro, Brasil	CCDB 5257	1	KM670950	1	KM670923
19	Cambiasca, Rio de Janeiro, Brasil	CCDB 5259	5	KM670951 - KM670955	1	KM670924
20	Paraty, Rio de Janeiro, Brasil	MNRJ 2699 e 8761, CCDB 2210	4	KM670946 - KM670949	1	KM670925
21	São Sebastião, São Paulo, Brasil	CCDB 2852	3	KM670943 - KM670945	1	KM670921
22	Ilhabela, São Paulo, Brasil	CCDB 2150, 2153, 2154, 2159, 2160	5	KM670938 - KM670942	1	KM670920

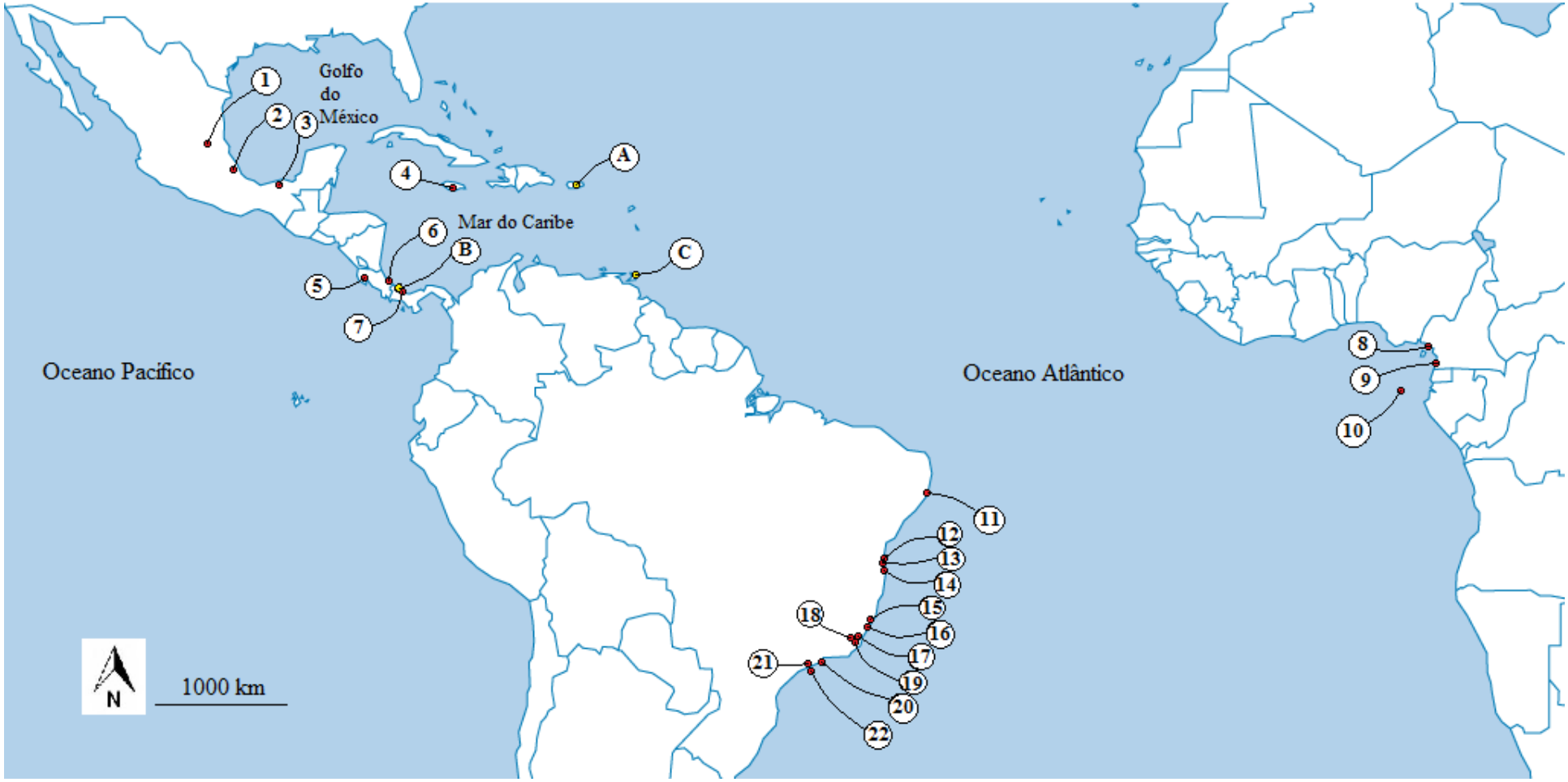

Figura 3: Localidades de coleta dos espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. Números referentes às localidades de origem dos espécimes estão na Tabela I. Letras referentes às localidades cujas sequências foram obtidas no GenBank. A: Porto Rico; B: Panamá e C: Trinidade e Tobago.

A identificação dos espécimes ocorreu por meio dos caracteres morfológicos já descritos na literatura, conforme apresentado nas chaves de identificação de CHACE (1972), HOBBS & HART (1982) e MELO (2003). O sexo foi distinguido com base na ausência ou presença do apêndice masculino no segundo par de pleópodes, característica útil na discriminação sexual de camarões carídeos (BAUER, 2004). A medição do comprimento da carapaça foi realizada da margem ocular até a margem posterior da mesma, com um paquímetro digital (0,01). Estes dados (sexo e tamanho) foram utilizados apenas para controle interno no laboratório.

Obtenção dos dados genéticos

Os dados genéticos foram obtidos segundo protocolos de MANTELATTO *et al.* (2006; 2007; 2009) e PILEGGI & MANTELATTO (2010) descritos a seguir, com ajustes necessários para o grupo taxonômico em questão. As sequências resultantes desse trabalho foram depositadas no banco de dados de sequências genéticas Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (Tabela I).

Extração do DNA

O tecido muscular foi extraído do abdômen dos espécimes de *A. scabra*, por meio de uma incisão na porção ventral entre os pleópodos 1 e 2 ou na porção lateral da segunda pleura abdominal (em casos de espécimes pequenos ou fêmeas ovígeras). Assim que extraído, o tecido foi colocado em um tubo com 600 µl de lysis buffer e 200 µl de Proteinase K 500 µl/mL e as amostras incubadas em banho seco por um período de 24-48 h a 55ºC (de acordo com a quantidade de tecido obtido e o tempo que a digestão enzimática e dissolução completa do tecido transcorriam). Em casos de dificuldade na dissolução, um passo adicional de maceração do tecido com ponteiras era

realizado após as primeiras 24 horas de incubação, seguido de no mínimo duas horas a mais de incubação, de acordo com a necessidade e dissolução.

Após a dissolução completa do tecido, foram adicionados 200 µl de NH_4 Oac 7,5M às amostras, em seguida as amostras passaram por uma centrifugação durante 10 minutos a 18ºC, dessa forma partículas residuais que podem dificultar a obtenção de DNA mais puro era decantada. O sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos com 600 µl de isopropanol e centrifugado por 10 minutos a 18ºC novamente. Em seguida, as amostras foram mantidas a -20ºC por no mínimo 48 h, esse passo tem a finalidade de decantar a maior quantidade possível de DNA. O *pellet* resultante desse processo foi lavado com 15 µl de ETOH 70% e em seguida liofilizado. Finalmente o DNA decantado em forma de *pellet* foi ressuspendido em 20 µl de tampão TE.

Os espécimes obtidos por empréstimos em coleções zoológicas, por apresentarem possibilidade de terem passado por distintos processos de fixação em formaldeído, passavam por uma etapa adicional, que consistia em lavagens por 24h com tampão GTE, seguida pelos passos citados de extração (PILEGGI, 2009). A concentração das amostras e a qualidade do DNA foram quantificadas utilizando o Espectofotômetro Nanodrop 2000®.

Amplificação, purificação e sequenciamento dos fragmentos de genes

A escolha dos genes que tiveram seus fragmentos amplificados e utilizados nas análises foi realizada com base no objetivo deste estudo. O DNA mitocondrial (mtDNA) é considerado mais variado do que o nuclear, pois apresentam altas taxas de mutação (atribuídas entre outros motivos a um mecanismo de reparo relativamente ineficaz e poucas regiões codificantes) (BROWN *et al.*, 1979) e as mutações que surgem nos indivíduos não passam por processo de recombinação durante a reprodução

sexual (herança materna) (AVISE *et al.*, 1987). Assim, marcadores mitocondriais são reputados como indicadores sensíveis aos processos populacionais (MORITZ *et al.*, 2007). Adicionalmente, o mtDNA é amplamente utilizado por sua acessibilidade, o seu grande uso e facilidades nas técnicas de obtenção (AVISE *et al.*, 1987).

O gene Citocromo Oxidase I (COI) é o mais utilizado em estudos moleculares com crustáceos (COSTA *et al.*, 2007). Embora codificante (SCHUBART *et al.*, 2000), é um gene com variação intermediária (BENZIE, 1998), e demonstra variação suficiente para análises interespecíficas e intra-específicas (populacionais) (SCHUBART & HUBER, 2006; CRANDALL *et al.*, 2010) o que, entre outros motivos, o definiram como sendo o gene utilizado para a técnica do *DNA Barcoding* (COSTA *et al.*, 2007).

A subunidade ribossomal 16S (16S) é estrutural e não codificante, seu transcrito, um rRNA, constitui parte dos ribossomos mitocondriais, participando de processos catalíticos importantes na tradução de mRNAs em proteínas (SCHUBART *et al.*, 2000). Por esse motivo o gene apresenta a característica de ter regiões conservadas, permitindo análises interespecíficas e entre táxons mais abrangentes (PAGE *et al.*, 2005; SCHUBART & HUBER, 2006). Dessa forma, sequências parciais dos genes mitocondriais 16S e COI, em conjunto, constituem uma ferramenta eficiente no que tange a identificação de crustáceos em nível específico, constituindo uma ferramenta taxonômica importante (OCAMPO *et al.*, 2013), bem como o gene COI permite análises sobre variabilidade genética de diferentes populações de uma mesma espécie com uma boa resolução (SCHUBART & HUBER, 2006; CRANDALL *et al.*, 2010).

Os fragmentos dos genes citados foram amplificados por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) no Termociclador Veriti® (Applied Biosystems) com ciclos termais específicos, visando obter sequências de 16S de um indivíduo por

localidade analisada e sequências de COI de ao menos três indivíduos de cada localidade, de acordo com a disponibilidade de espécimes e de sucesso na obtenção dos dados genéticos desses. O ciclo do gene COI consistia em uma primeira etapa de desnaturação a 94°C (2 min), seguida de 35 ciclos [desnaturação a 94°C (30 seg), pareamento dos primers a 55°C (30 seg) e, por fim, uma etapa de extensão a 72°C (50 seg)]. Ao término as amostras passavam por uma extensão adicional a 72°C (3 min) e permaneciam em *holding* a 4ºC até serem retiradas do termociclador. Já o ciclo do gene 16S consistia nas mesmas etapas com variações de tempo, temperatura e número de ciclos: primeira desnaturação a 95°C (4 min), seguida de 40 ciclos [desnaturação a 95°C (45 seg), pareamento dos *primers* a 48°C (45 seg), extensão a 72°C (50 seg)] e, por fim, uma etapa adicional de extenção a 72º (5 min) seguidos do *holding* a 4ºC.

As amostras de DNA obtidas dos espécimes procedentes de outras coleções zoológicas (que não a CCDB) tiveram suas sequências parciais amplificadas por ciclos modificados, devido ao fato de apresentarem a possibilidade de terem passado por processos desconhecidos de fixação em formaldeído, que podem desnaturar ou fragmentar o DNA, dificultando sua amplificação (SCHANDER & HALANYCH, 2003; BUCKLIN & ALLEN, 2004). Assim, os seguintes ciclos foram adotados - COI: desnaturação inicial a 94°C (4 min), 40 ciclos [desnaturação a 94°C (45 seg), pareamento dos *primers* a 52°C (45 seg), extensão a 72°C (1 min e 10 seg)] e, por fim, uma etapa adicional de extensão a 72º (10 min) seguidos do *holding* a 4ºC; 16S: desnaturação inicial a 95°C (5 min), 40 ciclos [desnaturação a 95°C (50 seg), pareamento dos *primers* a 42°C (50 seg), extensão a 72°C (1 min e 15 seg)] e, ao final, uma etapa adicional de extensão a 72º (10 min) seguidos do *holding* a 4ºC.

Os reagentes utilizados nas reações de PCR foram: 4-6µL de Água ultrapura (H2O Milli-Q), 5µL de betaína (5M), 4µL de DNTPs (10 mM), 3µL de PCR Buffer

(10X), 3µL de MgCl2 (25 mM), 2,5µL de solução BSA 1%, 1µL de cada *primer* específico (10 ou 20 µM), 0,5µL *Thermus aquaticus* polimerase (5 U/µL) e 1µL do DNA previamente extraído (concentrações de 10-250ng). Dessa forma, os produtos do PCR foram obtidos em uma reação de volume total de 25 µ L. Os *primes* utilizados foram, 16S: 16Sbr - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT e 16Sar - CGCCTGTTTATCAAAAACAT (PALUMBI *et al.*, 1991); e COI: AtyaPL - CAGAGCTMGGACAACCAGGYAGAT e AtyaCR - GCAGATGTAAAGTAGGCTCG (PAGE *et al.*, 2013). Por fim, uma eletroforese em gel de agarose 1% era conduzida com a finalidade de analisar o resultado da amplificação.

Os produtos do PCR bem sucedidos (amplificados) eram, então, purificados com o Kit de Purificação SureClean® e a reação de sequenciamento realizada com Big Dye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado em sequenciadores automáticos ABI 3100 Genetic Analyzer® do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.

Análises moleculares

A edição, o consenso e o alinhamento das sequências foram realizados no *software* Bioedit 7.0.9.0 (HALL, 1999) e, em seguida, submetidas ao alinhamento no sistema BLAST, com a finalidade de comparar o resultado com o banco de dados BLASTn ("*Basic Local Alignment Search Tool*" - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml) e, assim, validar o consenso realizado com ambas as fitas, senso e anti-senso. A tradução das sequencias de nucleotídeos de COI foram checadas e não possuíam *stop-codons*, portanto se tratavam de cópias do

DNA mitocondrial e não de pseudogenes (resultado da introgressão de DNAmt no núcleo) (WEESE *et al.*, 2012), que pode ser comum em artrópodes e gerar resultados equivocados (BUHAY, 2009).

Nos alinhamentos finais, com todas as sequências que seriam em seguida utilizadas em cada análise, foram realizadas conferências dos sítios polimórficos encontrados. Essas consistiam da análise (checagem visual) dos esferogramas de ambas as fitas nas regiões que continham polimorfismos. Dessa forma, os sítios polimórficos (que fundamentam as análises populacionais e taxonômicas) eram duplamente checados (durante a edição/consenso e no alinhamento final), evitando erros que poderiam advir de um esferograma ambíguo ou ilegível (que pode resultar do sequenciamento).

Para os dois genes foram feitas análises de Maximum-Likelihood e divergência genética. A análise de Maximum-Likelihood foi realizada com RAxML 7.2.8 (STAMATAKIS, 2006) usando a versão online no site Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) (STAMATAKIS *et al.*, 2008). Os parâmetros utilizados foram os padrões para RAxML para o modelo de evolução GTR, que automaticamente determina quantos *bootstraps* são necessários para uma análise segura. Apenas resultados com relevância superior a 50% foram considerados. Foi calculada uma matriz de divergência genética pelo modelo de Kimura 2 parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) no *software* MEGA v5 (TAMURA *et al.*, 2011).

As análises de haplótipos e diferenciação genética do gene COI foram realizadas seguindo os protocolos de VERGAMINI *et al*. (2011), o número de haplótipos e diversidade haplotípica foram calculados no *software* DnaSP 4.10.9 (ROZAS & ROZAS, 1999). A rede de haplótipos foi construída pelo método de Median-Joining, no *software* Network (BANDELT *et al*., 1999). As diversidades nucleotídicas foram

calculadas por meio do *software* Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al*., 2005). Por fim, a diferenciação genética entre os grupos evidenciados pela árvore filogenética e pela rede de haplótipos foi analisada considerando a variação em cada sítio nucleotídico utilizando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al*., 1992). Essa mesma análise foi realizada também estruturando os grupos de acordo com a localidade geográfica e com ausência de estruturação.

Resultados

Subunidade ribossomal 16S

Foram geradas 18 sequências de indivíduos de *A. scabra*, correspondentes a 18 localidades distintas que contemplaram a ampla distribuição da espécie: Golfo do México, Mar do Caribe, Brasil e África (Tabela I e Figura 3). Três sequências de localidades adicionais, Porto Rico, Panamá e Trinidade e Tobago, foram obtidas no GenBank com intuito de aumentar o número de localidades analisadas (Tabela II).

Os grupos externos foram escolhidos de acordo com a relação filogenética encontrada nos trabalhos de HOBBS & HART (1982), BRACKEN *et al.* (2009b) e VON RINTELEN *et al.* (2012). Foram escolhidos primariamente dois grupos externos de espécies do gênero *Atya*, a morfologicamente mais semelhante disponível *Atya innocous* (Herbst, 1792) e uma mais basal do gênero, *Atya lanipes* Holthuis, 1963. Dois atyídeos, um filogeneticamente mais relacionado, *Jonga serrei* (Bouvier, 1909) e um basal, *Xiphocaris elongata* (Guérin-Méneville, 1855); por fim, um camarão carídeo de outra família *Macrobrachium australe* Guérin-Méneville, 1838 (Palaemonidae) (Tabela II). Dessa forma, a análise final consistiu em 21 sequências de *A. scabra* abrangendo 21 localidades, mais cinco sequencias de grupos externos. O alinhamento totalizou, então, 26 sequências de 538 pares de base informativos.

A análise de distância (Tabela III) demonstrou uma variabilidade genética intra-específica variando de 0 a 0,6% para *A. scabra*. Assim, quando comparadas as diferentes localidades, independente da distância geográfica delas, a variação é sempre muito pequena. Nota-se a ausência de variação entre as localidades brasileiras (0%), uma variabilidade relativamente maior entre localidades do Mar do Caribe (0 a 0,6%), uma pequena distância das localidades africanas em relação às brasileiras (0,2 a 0,4%)

ou das caribenhas (0 a 0,4%) e, em relação às localidades do México, encontraram-se desde ausência de variação até distâncias genéticas relativamente maiores (0 a 0,6%). No entanto, a divergência genética entre os indivíduos analisados nunca atingiu 1%.

Essa variação intra-específica é bastante pequena quando comparada às dos grupos externos mais próximos (co-genéricos), que ficaram entre 3,7 a 4,6%. Portanto, o *gap* de distância interespecífica do gênero é muito maior do que o máximo de variação encontrada intra-especificamente, e, por conseguinte, a validade taxonômica de *A. scabra* foi corroborada por essa análise. Progressivamente as distâncias genéticas ficam maiores conforme menor parentesco evolutivo do grupo em comparação, atingindo 31,1% quando comparados *A. scabra* ao camarão palaemonídeo.

Os resultados apresentados condizem com os encontrados na análise de Maximum-Likelihood (Figura 4), na qual a monofilia da espécie foi corroborada com valor de *bootstrap* alto (97%), refletindo a variabilidade intra-específica muito baixa quando comparada à interespecífica. Ambas as análises esboçam alguma subdivisão das localidades analisadas, sugerindo grupos mais aparentados entre si, contudo o nível de resolução do gene 16S foi baixo para análises populacionais. Essa subdivisão pode ser mais bem estudada com as análises feitas com o gene COI que é mais variável.

Tabela II: Informações dos exemplares cujas sequências parciais do gene mitocondrial 16S foram obtidas no GenBank.

Espécie	Localidade	Nº no GenBank
Atya scabra	Panama	EF489985
Atya scabra	Porto Rico	EF489984
Atya scabra	Trinidade e Tobago	EF489983
Atya innocous	Porto Rico	EF489987
Atya lanipes	Porto Rico	EF489990
Jonga serrei	Porto Rico	EF490003
Xiphocaris elongata	República Dominicana	EF490010
Macrobrachium australe	Nova Guiné	DQ681290

Tabela III (continua): Matriz de divergência genética (%) do gene mitocondrial 16S. As localidades de 1 a 21 correspondem a espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816). Os dados dos espécimes estão descritos nas Tabelas I e II. SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo; BA: Bahia.

Espécimes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
1. Ilhabela, SP, Brasil	-												
2. São Sebastião, SP, Brasil	0	-											
3. Paraty, RJ, Brasil	0	0	-										
4. Aperibé , RJ, Brasil	0	0	0	-									
5. São Fidélis, RJ, Brasil	0	0	0	0	-								
6. Cambiasca, RJ, Brasil	0	0	0	0	0	-							
7. Guarapari, ES, Brasil	0	0	0	0	0	0	-						
8. lhéus, BA, Brasil	0	0	0	0	0	0	0	-					
9. Itacaré, BA, Brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	-				
10. Maraú, BA, Brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-			
11. Kribe, Camarões	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-		
12. Limbe, Camarões	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	-	
13. Trinidade e Tobago	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	-
14. Bocas del Toro, Panamá	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
15. Panamá	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2
16. Costa Rica, Pacífico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
17. Jamaica	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
18. Porto Rico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
19. Puebla, México	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	0,6	0,4
20. Tabasco, México	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
21. Querétaro, México	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
22. *Atya innocous*	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,3	4,1	4,3
23. *Atya lanipes*	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	3,9	3,7	3,9
24. *Jonga serrei*	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7
25. *Xiphocaris elongata*	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,5	26,5	26,5
26. *Macrobrachium australae*	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	32,1	31,8	31,8	31,8

Tabela III (conclusão): Matriz de divergência genética (%) do gene mitocondrial 16S. As localidades de 1 a 21 correspondem a espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816). Os dados dos espécimes estão descritos nas Tabelas I e II. SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo; BA: Bahia.

Espécimes	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**
1. Ilhabela, SP, Brasil													
2. São Sebastião, SP, Brasil													
3. Paraty, RJ, Brasil													
4. Aperibé , RJ, Brasil													
5. São Fidélis, RJ, Brasil													
6. Cambiasca, RJ, Brasil													
7. Guarapari, ES, Brasil													
8. lhéus, BA, Brasil													
9. Itacaré, BA, Brasil													
10. Maraú, BA, Brasil													
11. Kribe, Camarões													
12. Limbe, Camarões													
13. Trinidade e Tobago													
14. Bocas del Toro, Panamá	-												
15. Panamá	0,2	-											
16. Costa Rica, Pacífico	0	0,2	-										
17. Jamaica	0	0,2	0	-									
18. Porto Rico	0	0,2	0	0	-								
19. Puebla, México	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	-							
20. Tabasco, México	0	0,2	0	0	0	0,4	-						
21. Querétaro, México	0	0,2	0	0	0	0,4	0	-					
22. *Atya innocous*	4,3	4,6	4,3	4,3	4,3	3,9	4,3	4,3	-				
23. *Atya lanipes*	3,9	4,1	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	4,8	-			
24. *Jonga serrei*	15,7	15,4	15,7	15,7	15,7	15,9	15,7	15,7	15,1	16,2	-		
25. *Xiphocaris elongata*	26,5	26,2	26,5	26,5	26,5	26,5	26,5	26,5	26,0	26,8	26,4	-	
26. *Macrobrachium australae*	31,8	31,4	31,8	31,8	31,8	31,8	31,8	31,8	29,8	32,1	31,5	33,9	-

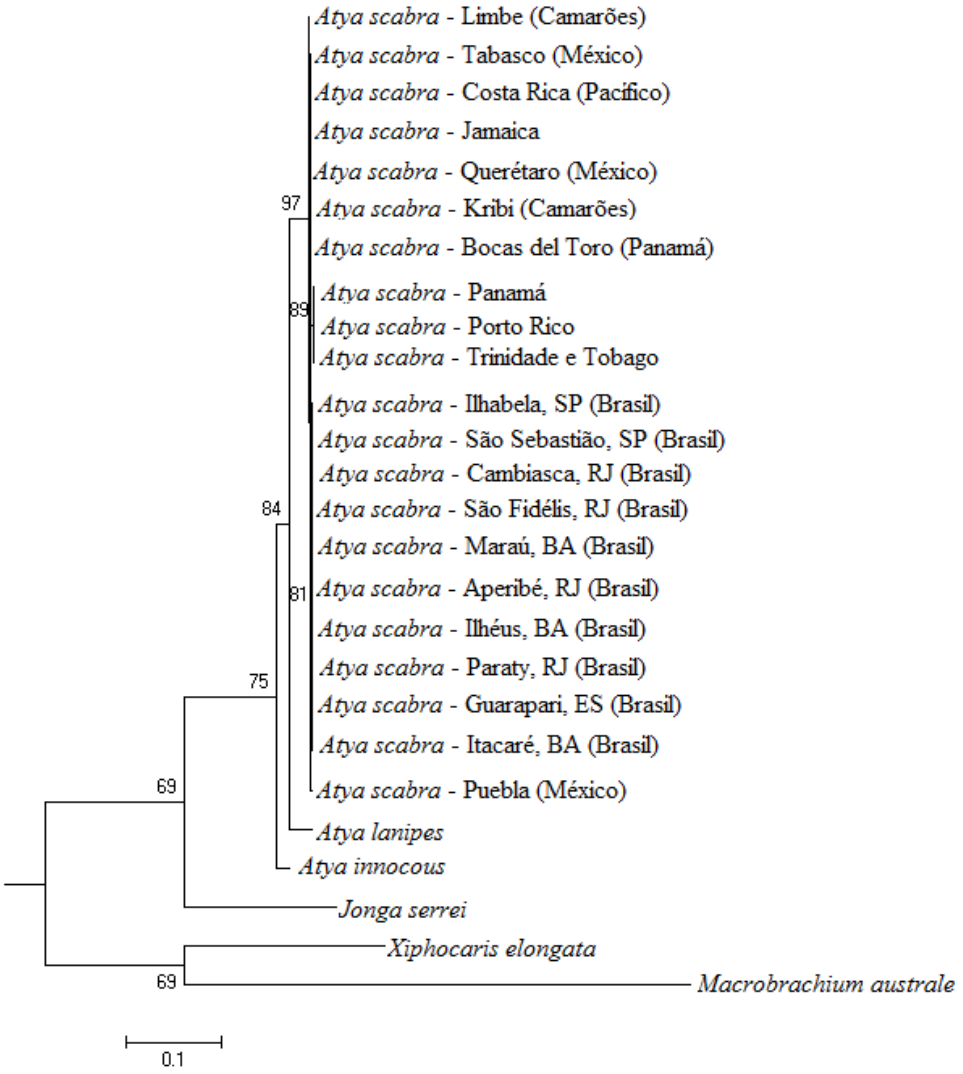

Figura 4: Dendograma para o gene mitocondrial 16S dos espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) e outras espécies usando a análise de Maximum-Likelihood. Os números apresentados correspondem aos valores de significância para 1000 réplicas de *bootstraps*, apenas valores de *bootstraps* > 50% são mostrados. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo.

Citocromo Oxidase I (COI)

Foram sequenciados fragmentos do gene COI de 63 indivíduos de *A. scabra*, correspondentes a 22 localidades distintas que contemplaram a ampla distribuição da espécie: três localidades do Golfo do México, quatro do Mar do Caribe, 12 do Brasil e três da África (Tabela I e Figura 3). Sequências de três localidades adicionais, Porto Rico, Panamá e Trinidade e Tobago, foram obtidas no GenBank com intuito de aumentar o número de localidades analisadas. Dessa forma, foi possível realizar uma análise mais robusta com 234 sequências de 591 pares de base informativos (Tabela IV).

Para as análises de distância e de Maximum-Likelihood foram escolhidos dois grupos externos, os mesmos dois co-genéricos escolhidos na análise de 16S, devido aos mesmos motivos anteriormente citados (morfologicamente mais semelhante e um mais basal). Grupos externos de diferentes grupos, como de outros gêneros ou espécies de outra família não foram empregados devido aos *primers* específicos para o gênero *Atya* utilizados na amplificação do gene COI, que impossibilitaram comparação com fragmentos disponíveis em bancos de dados ou até mesmo obtenções próprias.

Tabela IV: Informações dos exemplares cujas sequências parciais do gene mitocondrial Citotromo Oxidase I foram obtidas no GenBank. Números entre parênteses significam o número de espécimes incluídos na análise que tinham haplótio igual.

Espécie	Localidade	Nº no GenBank	Total
Atya scabra	Panamá	JF810967 - JF810982 (4)	19
	Porto Rico	EU005084 - EU005224	140
	Trinidade e Tobago	JF810970, JF810971, JF810977, JF810983, JF810984 (2), JF810985 - JF810990	12
Atya innocous	Porto Rico	EU005051	1
Atya lanipes	Porto Rico	EU005069	1

A análise de distância quantificou a variabilidade genética intra-específica de *A. scabra* entre 0 a 8,6%. Entre as localidades brasileiras a variação foi a mais baixa, com máximo de 1,4%. Entre as localidades africanas houve variação de 1,7 a 2,1%. O Caribe exibiu variabilidade de 0 a 4%. Por fim, a comparação entre as localidades do México ficou entre 0 a 2,1%. Quando comparados grandes grupos de localidades foram obtidas as seguintes distâncias (1) Brasil x África: de 1,9 a 2,8%; (2) Brasil x Caribe: de 0 a 3,7%; (3) Brasil x México: de 6,2 a 8,1%; (4) África x Caribe: de 1,4 a 3,7%; (5) África x México: de 6,4 a 8,0%; (6) Caribe x México: de 6,1 a 8,6%. Finalmente, quando comparados todas as localidades em relação ao grupo mais destoante, o formado pelas localidades do México, o intervalo de distância ficou entre 5,9 a 8,6%. (Tabela V).

Portanto, foi possível constatar a afinidade genética entre as localidades do Caribe com Brasil e África, bem como uma evidente divergência genética das sequências obtidas de localidades mexicanas. Todavia, o nível de divergência interspecífico, considerando as duas espécies utilizados de grupo externo, ficou entre 12,8 a 17,4% (Tabela V). Assim, o *gap* interespecífico é maior do que a variabilidade notada intra-especificamente na espécie e mesmo as localidades mais divergentes, como as do México, não apresentaram distância suficiente para serem consideradas espécies distintas. Por conseguinte, para o nível de resolução do gene COI a validade taxonômica de *A. scabra* também foi corroborada ao longo de sua distribuição.

A análise de Maximum-Likelihood corroborou a análise de divergência genética, evidenciando a monofilia da espécie com alto valor de *bootstrap* (100%). Posicionou o grupo México como grupo irmão dos demais espécimes, e distinguiram os grupos Caribe, Brasil mais Caribe e África (Figura V).

Tabela V (continua): Matriz de divergência genética (%) do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I. As localidades de 1 a 25 correspondem a espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816). Os dados dos espécimes estão descritos nas Tabelas I e IV. Os números entre parêntesis correspondem ao número de espécimes analisados de cada localidade. A divergência mínima e máxima são apresentadas. SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo; BA: Bahia; A: Atlântico; P: Pacífico.

Espécimes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1. Ilhabela, SP, Brasil (5)	0,2-1,0									
2. São Sebastião, SP, Brasil (3)	0,0-1,0	0,0-0,7								
3. Paraty, RJ, Brasil (4)	0,0-1,0	0,0-1,0	0,3-0,9							
4. Aperibé, RJ, Brasil (4)	0,0-1,2	0,0-1,4	0,0-1,2	0,2-1,0						
5. São Fidélis, RJ, Brasil (1)	0,2-1,2	0,7-1,0	0,2-1,0	0,5-1,4	-					
6. Cambiasca, RJ, Brasil (5)	0,0-1,2	0,0-0,9	0,0-1,2	0,0-1,5	0,5-1,2	0,2-1,0				
7. Guarapari, ES, Brasil (1)	0,2-1,2	0,7-1,0	0,2-1,0	0,5-1,4	0,0	0,5-1,2	-			
8. Viana, ES, Brasil (1)	0,3-0,9	0,3-0,7	0,3-0,7	0,2-1,0	0,7	0,2-0,5	0,7	-		
9. Ilhéus, BA, Brasil (5)	0,0-0,9	0,0-0,7	0,0-0,7	0,0-1,0	0,3-0,7	0,0-0,9	0,3-0,7	0,3	0,0-0,3	
10. Itacaré, BA, Brasil (6)	0,0-1,4	0,0-1,0	0,0-1,4	0,0-1,7	0,5-1,4	0,0-1,2	0,5-1,4	0,2-1,0	0,0-1,0	0,0-1,2
11. Maraú, BA, Brasil (5)	0,0-0,9	0,0-0,9	0,0-0,7	0,0-1,0	0,5-0,9	0,0-1,0	0,5-0,9	0,0-0,5	0,0-0,5	0,0-1,2
12. Pernambuco, Brasil (1)	0,0-0,5	0,0-0,7	0,0-0,5	0,0-0,7	0,7	0,0-0,9	0,7	0,3	0,0-0,3	0,0-1,0
13. São Tomé e Príncipe (1)	1,9-2,2	2,1-2,2	2,1-2,4	1,9-2,8	2,4	1,9-2,4	2,4	2,1	2,1	1,9-2,6
14. Kribe, Camarões (1)	1,9-2,2	2,1	2,1-2,4	1,9-2,8	2,4	1,9-2,2	2,4	2,1	2,1	1,9-2,4
15. Limbe, Camarões (3)	1,7-2,6	1,9-2,4	1,9-2,8	1,7-2,8	2,2-2,8	1,7-2,6	2,2-2,8	1,9-2,4	1,9-2,4	1,7-2,8
16. Trinidade e Tobago (12)	0,0-2,6	0,0-2,6	0,0-2,8	0,0-3,1	0,7-2,8	0,0-2,8	0,7-2,8	0,3-2,4	0,0-2,4	0,0-2,9
17. Bocas del Toro, Panamá (1)	1,7-2,1	1,9-2,1	1,9-2,2	1,7-2,6	2,2	1,7-2,2	2,2	1,9	1,9	1,7-2,4
18. Panamá (19)	0,0-2,4	0,5-2,4	0,0-2,4	0,3-2,8	0,2-2,6	0,3-2,6	0,2-2,6	0,5-2,2	0,2-2,2	0,3-2,8
19. Limón, Costa Rica, A (6)	1,4-2,6	1,4-2,6	0,9-2,6	1,0-2,8	1,7-2,8	1,2-2,8	1,7-2,8	1,4-2,4	1,0-2,4	1,2-2,9
20. Costa Rica, P (1)	1,7-2,1	1,9-2,1	1,9-2,2	1,7-2,6	2,2	1,7-2,2	2,2	1,9	1,9	1,7-2,4
21. Jamaica (2)	1,5-2,6	1,7-2,6	1,7-2,6	1,5-2,4	2,1-2,8	1,5-2,8	2,1-2,8	1,7-2,4	1,7-2,4	1,5-2,9
22. Porto Rico (140)	0,0-3,5	0,0-3,5	0,0-3,7	0,0-4,0	0,2,3,7	0,0-3,7	0,2,3,7	0,2-3,3	0,0-3,3	0,0-3,8
23. Puebla, México (3)	6,2-7,6	6,6-7,6	6,2-7,8	6,4-8,2	7,0-7,8	6,2-7,8	7,0-7,8	6,6-7,4	6,6-7,4	6,4-7,7
24. Tabasco, México (3)	7,2-8,0	7,6-7,8	7,4-8,1	7,4-8,5	8,0-8,1	7,2-8,0	8,0-8,1	7,6-7,8	7,6-7,8	7,4-8,0
25. Querétaro, México (1)	6,2-6,8	6,6-6,8	6,2-7,0	6,4-7,4	0,1	6,2-7,0	0,1	6,6	6,6	6,4-7,0
26. *Atya innocous* (1)	15,6 -16,2	16,0-16,2	15,6-16,7	16,0-16,9	15,8	16,5	15,8	15,8	15,8-16,2	16,0-16,5
27. *Atya lanipes*(1)	15,6-15,8	15,4-15,8	15,2-15,8	15,4-16,2	15,6	0,2	15,6	15,8	15,4-15,8	15,6-16,0

Tabela V (continuação): Matriz de divergência genética (%) do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I. As localidades de 1 a 25 correspondem a espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816). Os dados dos espécimes estão descritos nas Tabelas I e IV. Os números entre parêntesis correspondem ao número de espécimes analisados de cada localidade. A divergência mínima e máxima são apresentadas. SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo; BA: Bahia; A: Atlântico; P: Pacífico.

Espécimes	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
1. Ilhabela, SP, Brasil (5)										
2. São Sebastião, SP, Brasil (3)										
3. Paraty, RJ, Brasil (4)										
4. Aperibé, RJ, Brasil (4)										
5. São Fidélis, RJ, Brasil (1)										
6. Cambiasca, RJ, Brasil (5)										
7. Guarapari, ES, Brasil (1)										
8. Viana, ES, Brasil (1)										
9. Ilhéus, BA, Brasil (5)										
10. Itacaré, BA, Brasil (6)										
11. Maraú, BA, Brasil (5)	0,0-0,5									
12. Pernambuco, Brasil (1)	0,0-0,3	-								
13. São Tomé e Príncipe (1)	1,9-2,2	2,1	-							
14. Kribe, Camarões (1)	1,9-2,2	2,1	1,7	-						
15. Limbe, Camarões (3)	1,7-2,6	1,9-2,4	1,7-2,1	0,2-0,7	0,5-1,0					
16. Trinidade e Tobago (12)	0,0-2,6	0,0-2,4	1,9-2,6	1,9-2,6	1,9-2,9	0,0-2,6				
17. Bocas del Toro, Panamá (1)	1,7-2,1	1,9	2,1	2,1	2,1-2,4	0,2-2,2	-			
18. Panamá (19)	0,3-2,2	0,5-2,1	1,9-2,4	1,7-2,4	1,7-2,8	0,0-2,8	0,2-2,2	0,0-2,6		
19. Limón, Costa Rica, A (6)	1,2-2,4	1,4-2,2	1,9-2,9	2,1-2,6	2,1-2,9	0,0-2,8	0,3-2,6	0,0-2,9	0,2-3,1	
20. Costa Rica, P (1)	1,7-2,1	1,9	1,9	1,9	1,9-2,2	2,2-2,9	0,5	0,3-2,2	0,5-2,6	-
21. Jamaica (2)	1,5-2,4	1,7-2,1	1,9-2,4	1,9-2,4	1,9-2,8	0,0-2,6	0,2-1,0	0,0-2,8	0,2-2,6	0,3-0,9
22. Porto Rico (140)	0,0-3,5	0,0-3,3	1,7-3,7	1,5-3,6	1,4-3,7	0,0-3,7	0,2-2,8	0,0-3,7	0,0-3,5	0,2-2,6
23. Puebla, México (3)	6,4-7,6	6,6-7,4	6,8-7,6	6,4-7,2	6,1-7,6	6,1-7,6	6,4-7,2	6,1-7,8	6,2-7,6	6,6-7,4
24. Tabasco, México (3)	7,4-8,0	7,6-7,8	7,8-8,0	7,4-7,6	7,0-8,0	7,2-8,2	7,6-7,8	7,2-8,2	7,4-8,0	7,8-8,0
25. Querétaro, México (1)	6,4-6,8	6,6	6,8	6,4	6,1-6,8	6,1-6,8	6,4	6,1-7,0	6,2-6,8	6,6
26. *Atya innocous* (1)	15,8-16,5	16,2	15,3	15,8	16,0-16,2	15,1-16,2	0,2	15,3-15,6	15,1-16,0	14,9
27. *Atya lanipes*(1)	15,6-16,0	15,8	15,2	15,8	15,8-16,1	15,6-16,7	0,2	15,6-16,5	14,9-16,5	1,2

Tabela V (conclusão): Matriz de divergência genética (%) do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I. As localidades de 1 a 25 correspondem a espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816). Os dados dos espécimes estão descritos nas Tabelas I e IV. Os números entre parêntesis correspondem ao número de espécimes analisados de cada localidade. A divergência mínima e máxima são apresentadas. SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo; BA: Bahia; A: Atlântico; P: Pacífico.

Espécimes	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**
1. Ilhabela, SP, Brasil (5)							
2. São Sebastião, SP, Brasil (3)							
3. Paraty, RJ, Brasil (4)							
4. Aperibé, RJ, Brasil (4)							
5. São Fidélis, RJ, Brasil (1)							
6. Cambiasca, RJ, Brasil (5)							
7. Guarapari, ES, Brasil (1)							
8. Viana, ES, Brasil (1)							
9. Ilhéus, BA, Brasil (5)							
10. Itacaré, BA, Brasil (6)							
11. Maraú, BA, Brasil (5)							
12. Pernambuco, Brasil (1)							
13. São Tomé e Príncipe (1)							
14. Kribe, Camarões (1)							
15. Limbe, Camarões (3)							
16. Trinidade e Tobago (12)							
17. Bocas del Toro, Panamá (1)							
18. Panamá (19)							
19. Limón, Costa Rica, A (6)							
20. Costa Rica, P (1)							
21. Jamaica (2)	0,9						
22. Porto Rico (140)	0,0-3,1	0,2-4,0					
23. Puebla, México (3)	6,2-8,0	5,9-8,0	0,5-0,9				
24. Tabasco, México (3)	7,4-8,6	6,8-8,6	1,0-1,9	1,5-2,1			
25. Querétaro, México (1)	6,2-7,2	5,9-7,2	0,3-0,7	1,0-1,5	-		
26. *Atya innocous* (1)	15,3-15,8	14,9-16,5	14,7-15,4	15,0-15,8	14,7	-	
27. *Atya lanipes*(1)	16,0-16,5	14,9-17,4	12,8-13,3	12,8-13,9	12,8	0,1	-

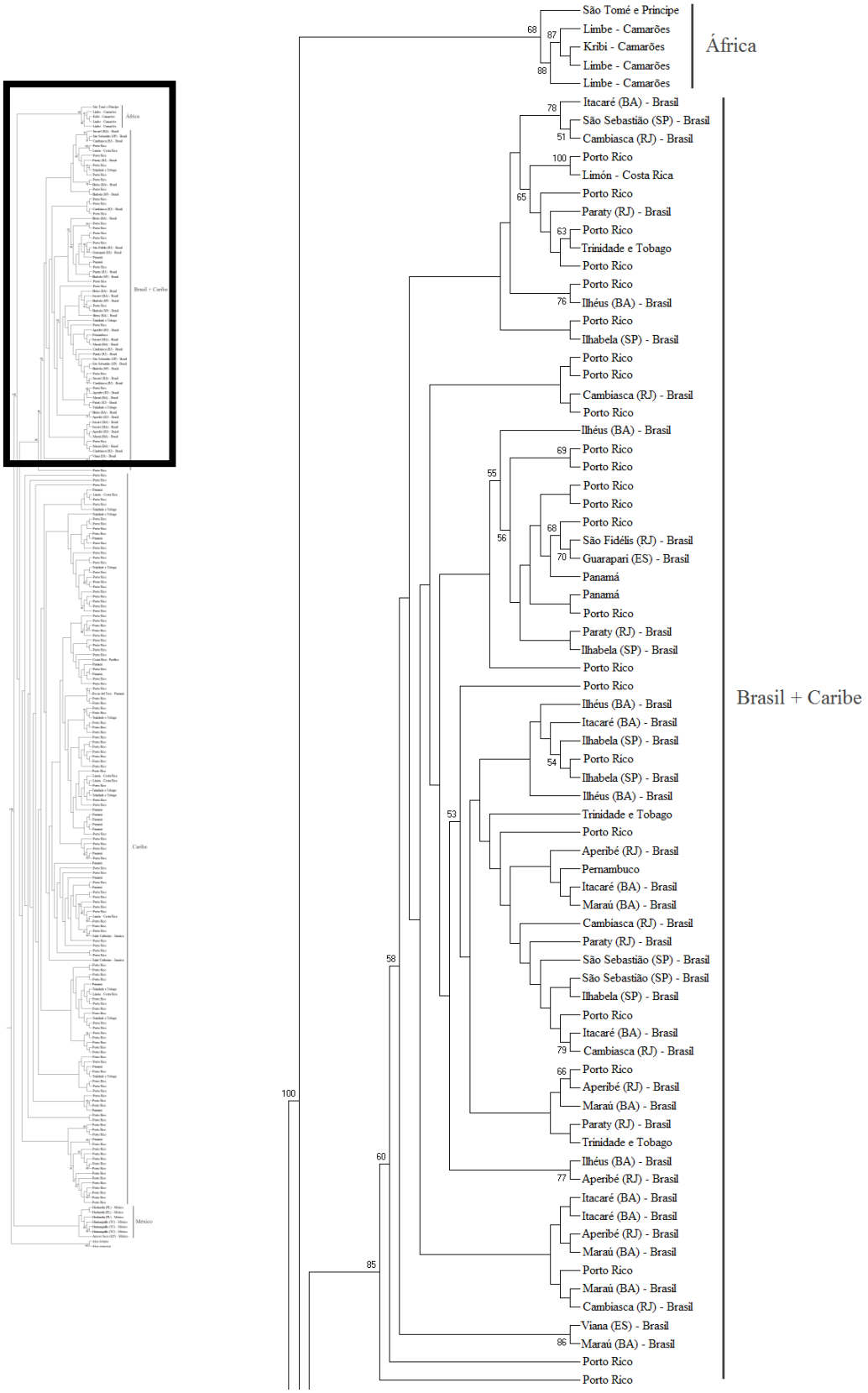

Figura 5 (continua): Dendograma para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I dos espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) e outras espécies usando a análise de Maximum-Likelihood. Os números apresentados correspondem aos valores de significância para 500 réplicas de *bootstraps*, apenas valores de *bootstraps* > 50% são mostrados. A esquerda: dendograma completo e a direita detalhe de parte do dendograma. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

Figura 5 (continuação): Dendograma para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I dos espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) e outras espécies usando a análise de Maximum-Likelihood. Os números apresentados correspondem aos valores de significância para 500 réplicas de *bootstraps*, apenas valores de *bootstraps* > 50% são mostrados. A esquerda: dendograma completo e a direita detalhe de parte do dendograma.BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

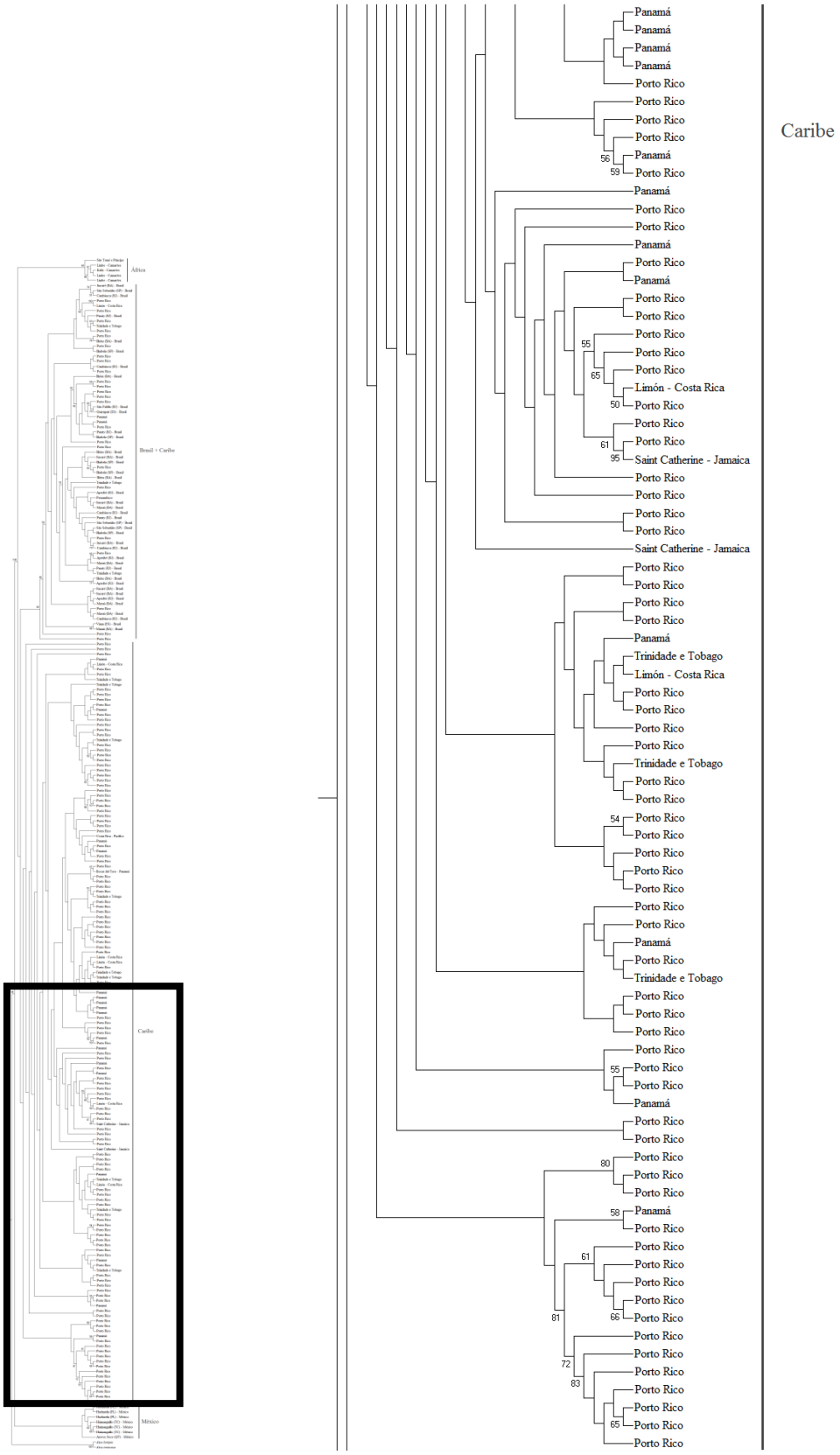

Figura 5 (continuação): Dendograma para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I dos espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) e outras espécies usando a análise de Maximum-Likelihood. Os números apresentados correspondem aos valores de significância para 500 réplicas de *bootstraps*, apenas valores de *bootstraps* > 50% são mostrados. A esquerda: dendograma completo e a direita detalhe de parte do dendograma. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

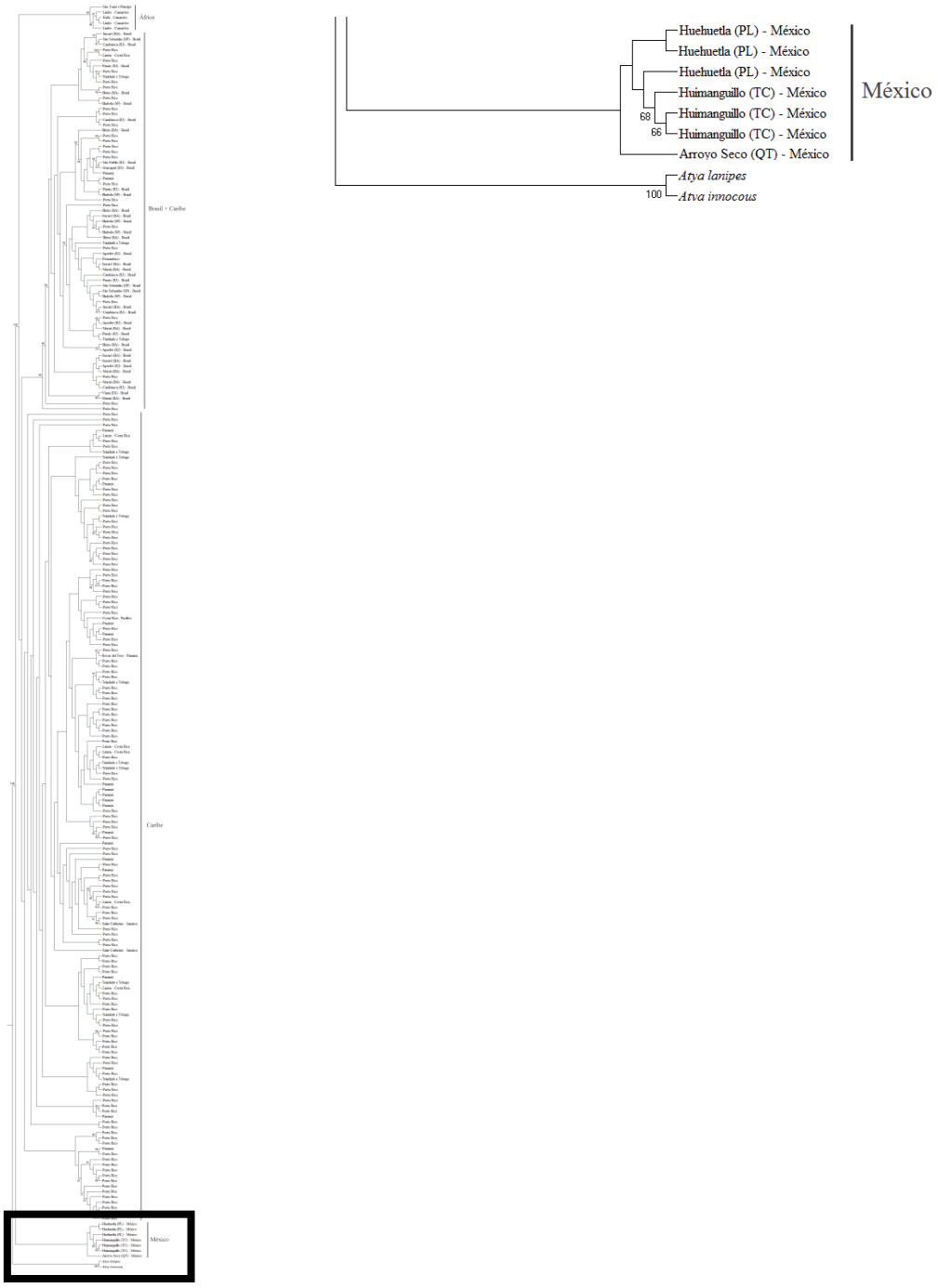

Figura 5 (conclusão): Dendograma para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I dos espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) e outras espécies usando a análise de Maximum-Likelihood. Os números apresentados correspondem aos valores de significância para 500 réplicas de *bootstraps*, apenas valores de *bootstraps* > 50% são mostrados. A esquerda dendograma completo e a direita detalhe de parte do dendograma. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

A diversidade haplotípica encontrada foi de 0,9947, com 189 haplótipos (Tabela VI) distintos exibidos na rede de haplótipos (Figura 6). Dentro dos 591 pares de base analisados foram encontrados 144 sítios polimórficos. A rede de haplótipos também evidenciou os mesmos grupos já citados anteriormente (Brasil + Caribe, África, Caribe e México) congruentes com os da análise de Maximum-Likelihood. No total, 16 haplótipos foram compartilhados, sendo que o haplótipo com maior número de indivíduos compartilhados foi o H-1, com 13 indivíduos provenientes de 11 localidades (nove brasileiras e duas do Caribe) (Tabela VII). O grupo do Brasil compartilhou mais três haplótipos com localidades do grupo do Caribe: H-3, H-12 e H-19. É relevante também o fato de que diversos haplótipos sequenciados de indivíduos de localidades do Caribe se posicionaram mais próximos geneticamente ao grupo formado majoritariamente por localidades brasileiras (Brasil) (Figura 6A e B).

Localidades brasileiras também compartilharam haplótipos entre si, um total de sete (H-1, H-3, H-9, H-12, H-15 e H-16), sendo que o haplótipo H-1 é constituído por localidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco, unindo as mais distantes localidades amostradas do país (Figura 6A e B). Entre as localidades do Caribe, oito haplótipos foram compartilhados, incluindo sequencias oriundas de localidades distantes como Jamaica, Costa Rica, Porto Rico, Panamá, e Trinidade e Tobago (H-22, H-26, H-27, H-30, H-31, H-38, H-39 e H-43) (Figura 6C). Os haplótipos referentes às localidades amostradas da África formaram um grupo bastante próximo aos grupos Brasil + Caribe e Caribe, porém não houveram compartilhamentos de haplótipos (Figura 6A e B). Finalmente, os haplótipos encontrados para as sequências de espécimes oriundos das localidades mexicanas foram todos únicos e distintos, portanto não foram compartilhados entre si, tampouco com outros grupos. Além disso, o grupo

do México ficou isolado na rede de haplótipos, com 31 passos mutacionais separando-o do grupo mais próximo (Caribe) (Figura, D).

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada sem estruturação genética (incorporando todas as localidades como um só grande grupo) revelou uma variabilidade nucleotídeca total de 0,18024 +/- 0,09114 e índice de fixação FST de 0,427 (Tabela VII). Duas análises estruturando-se grupos foram conduzidas, a primeira levou em consideração a origem geográfica das sequências, ou seja, as localidades de origem dos espécimes, já a segunda reuniu os indivíduos de acordo com os grupos genéticos evidenciados pela rede de haplótipos e análises de Maximum Likelihood. Desse modo, foi possível corroborar que existe uma maior relevância dos grupos genéticos formados do que as localidades geográficas, pois a divergência entre os grupos e o índice FST foram maiores na segunda análise (Tabela VII). Consequentemente, embora exista uma marcante estruturação genética, essa não é necessariamente congruente com as distâncias ou localidades geográficas, sobretudo quando levado em consideração a junção do grupo Brasil + Caribe e a proximidade do grupo África com os grupos Caribe e Brasil + Caribe.

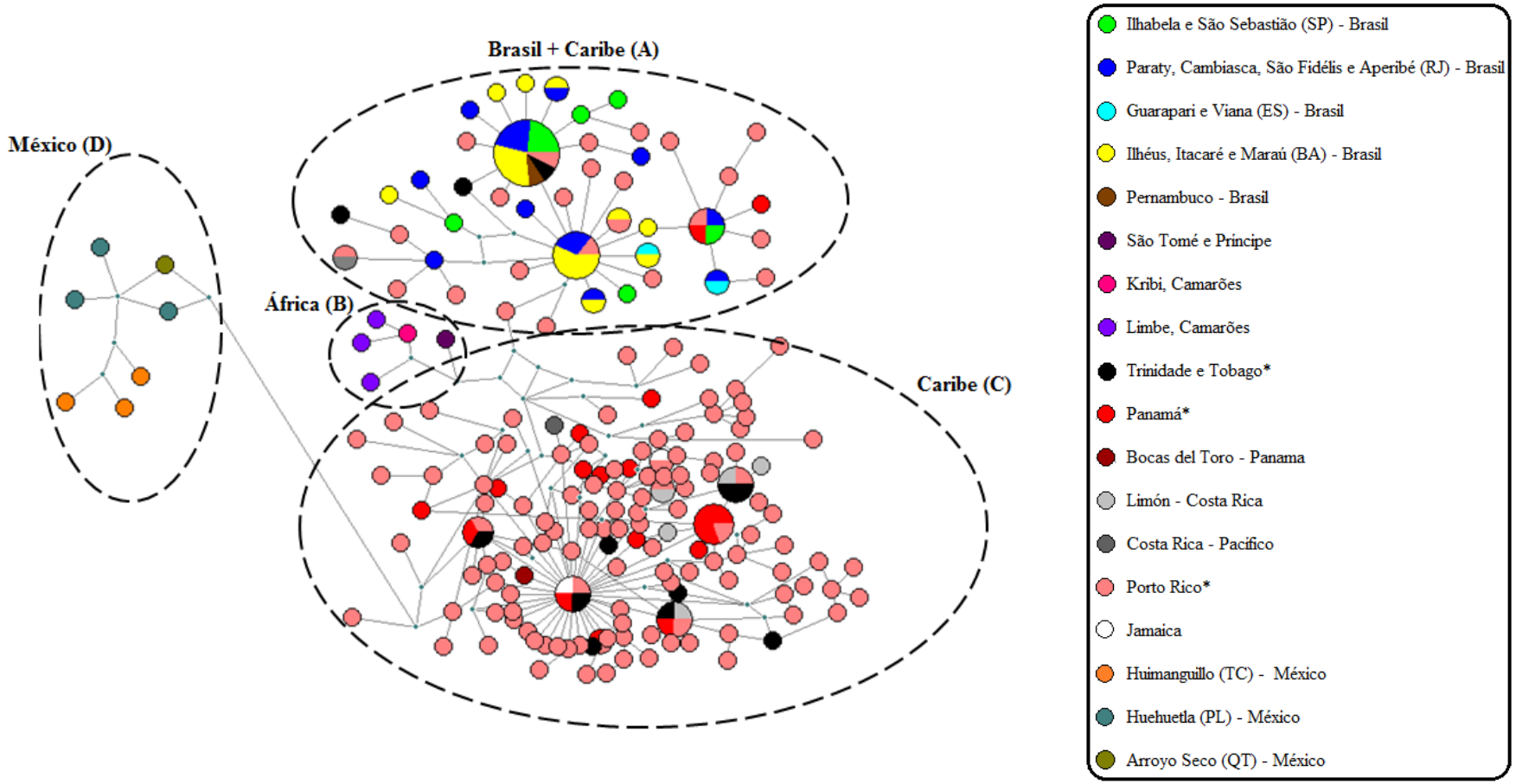

Figura 6 (continua): Rede de haplótipos construída pelo método de Median-Joining, indicando a distribuição dos 189 haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo. Os pontos verdes pequenos representam os vetores médios. * sequências obtidas no genbank. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

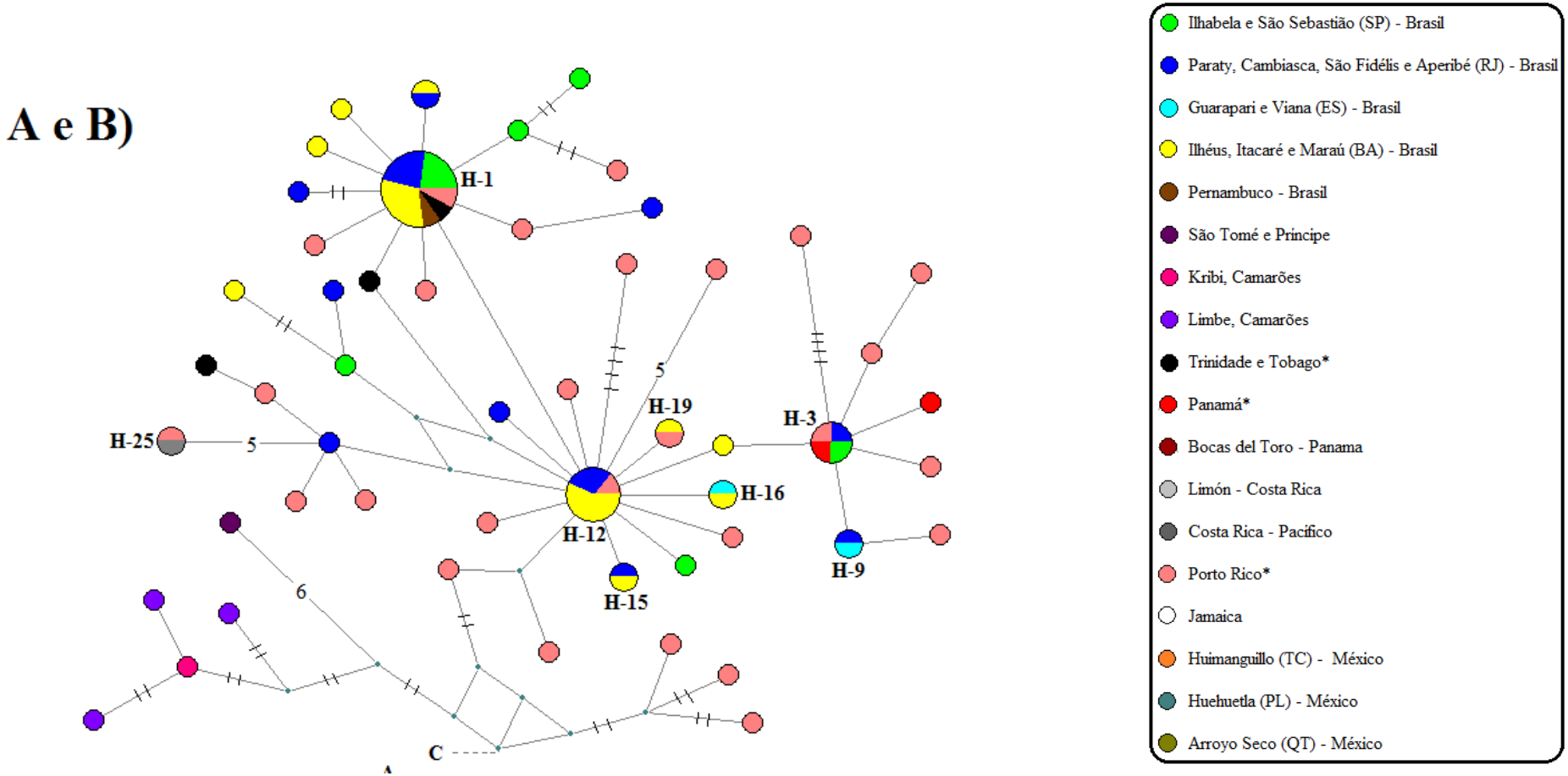

Figura 6 (continuação): Rede de haplótipos construída pelo método de Median-Joining, indicando a distribuição dos 189 haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo. Todos os haplótipos estão separados por um passo mutacional, com exceção daqueles nos quais o número de traços ou um número indicam a quantidade passos mutacionais entre eles. Cada traço ou número representam passos mutacionais, a ausência desses representa um passo mutacional de distância. Os pontos verdes pequenos representam os vetores médios. * sequências obtidas no genbank. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

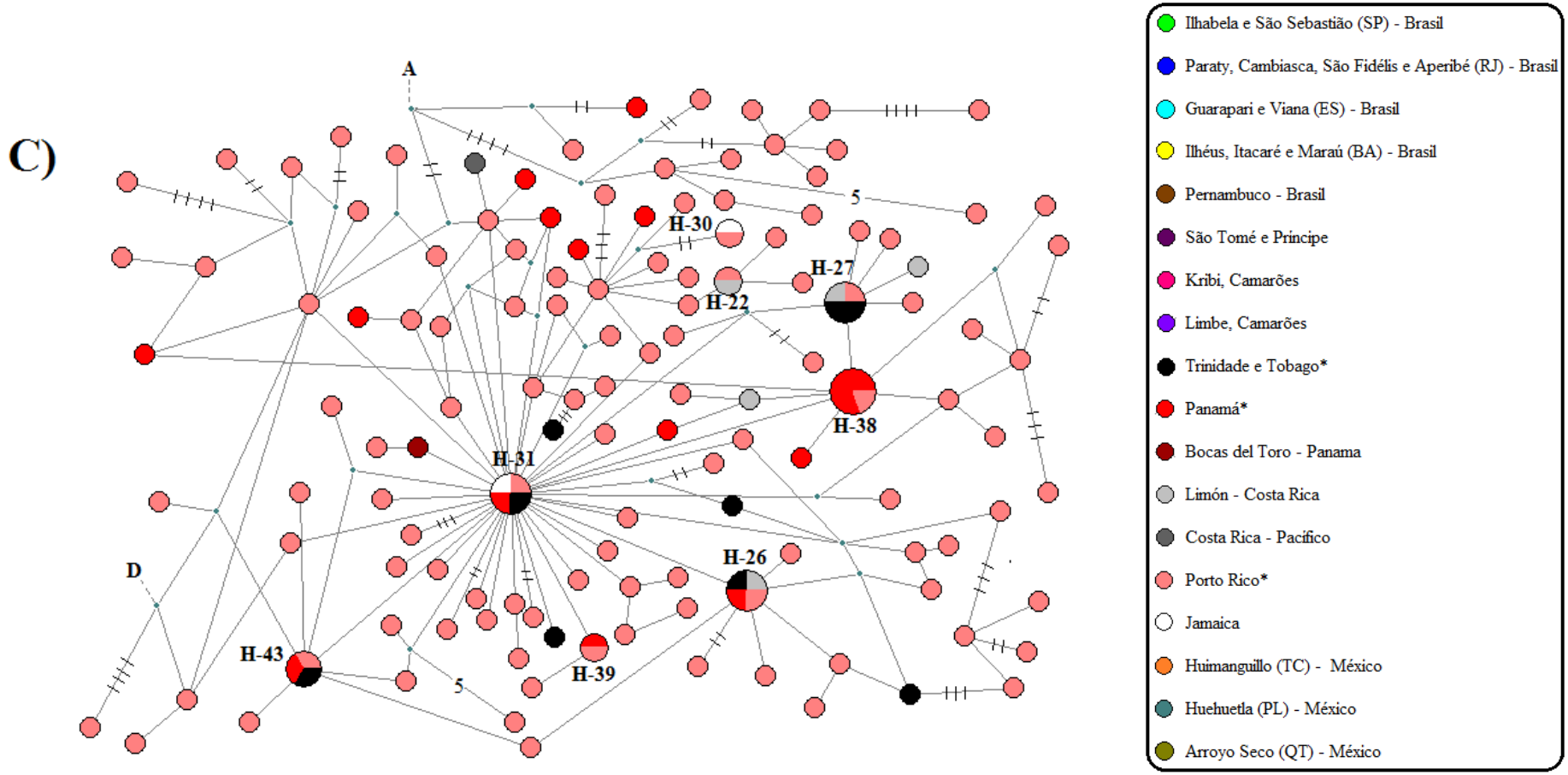

Figura 6 (continuação): Rede de haplótipos construída pelo método de Median-Joining, indicando a distribuição dos 189 haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo. Todos os haplótipos estão separados por um passo mutacional, com exceção daqueles nos quais o número de traços ou um número indicam a quantidade passos mutacionais entre eles. Cada traço ou número representam passos mutacionais, a ausência desses representa um passo mutacional de distância. Os pontos verdes pequenos representam os vetores médios. * sequências obtidas no genbank. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

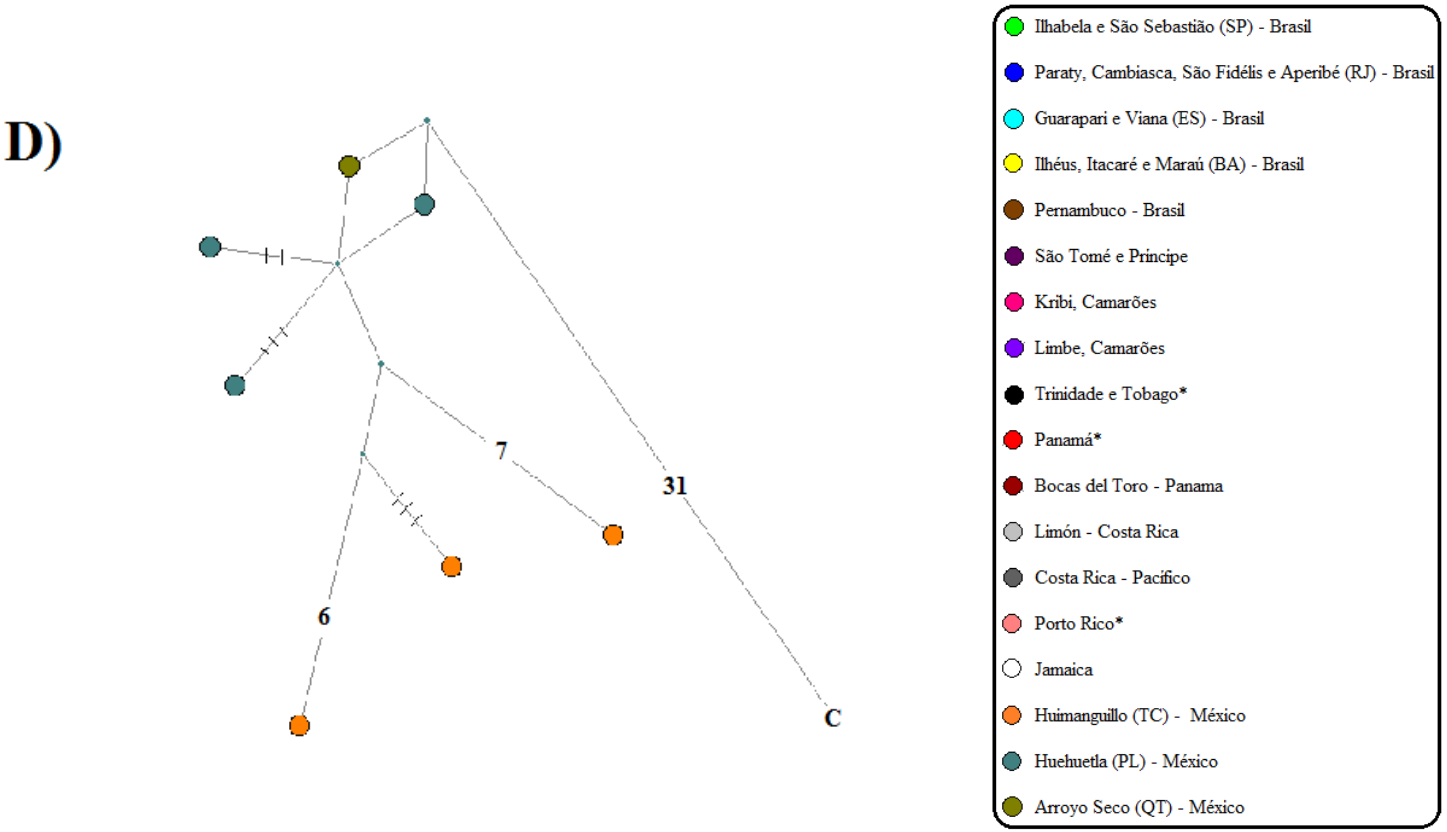

Figura 6 (conclusão): Rede de haplótipos construída pelo método de Median-Joining, indicando a distribuição dos 189 haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo. Todos os haplótipos estão separados por um passo mutacional, com exceção daqueles nos quais o número de traços ou um número indicam a quantidade passos mutacionais entre eles. Cada traço ou número representam passos mutacionais, a ausência desses representa um passo mutacional de distância. Os pontos verdes pequenos representam os vetores médios. * sequências obtidas no genbank. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

Tabela VII (continua). Distribuição dos haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. Dn: diversidade nucleotídica. * sequências obtidas no genbank. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

Localidades	**Haplótipos**																		
	1	**2**	**3**	**4-5**	**6**	**7-8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17-18**	**19**	**20**	**21**	**22**
Ilhabela (SP) – Brasil	1	1	1	1															
São Sebastião (SP) – Brasil	2				1														
Paraty (RJ) – Brasil	1		1			1													
Cambiasca (RJ) – Brasil	1							1	1	1	1								
São Fidélis (RJ) – Brasil							1												
Aperibé (RJ) – Brasil	1									1		1	1						
Guarapari (ES) – Brasil							1												
Viana (ES) – Brasil														1					
Ilhéus (BA) – Brasil	2												1			1	1		
Itacaré (BA) – Brasil	1							1		2					1				
Maraú (BA) – Brasil	1									2				1				1	
Pernambuco – Brasil	1																		
São Tomé e Príncipe																			
Kribi – Camarões																			
Limbe – Camarões																			
Trinidade e Tobago*	1																		
Panamá*			1																
Porto Rico*	1		1							1						1			1
Bocas del Toro – Panamá																			
Limón - Costa Rica																			1
Costa Rica – Pacífico																			
Jamaica																			
Huimanguillo (TC) – México																			
Huehuetla (PL) – México																			
Arroyo Seco (QT) – México																			
Total	13	1	4	1	1	1	2	2	1	7	1	1	2	2	1	2	1	1	2

Tabela VII (continuação). Distribuição dos haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. Dn: diversidade nucleotídica. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

Localidades	**Haplótipos**																
	23-24	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32-34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40-42**	**43**	**44-49**
Ilhabela (SP) – Brasil																	
São Sebastião (SP) - Brasil																	
Paraty (RJ) – Brasil																	
Cambiasca (RJ) - Brasil																	
São Fidélis (RJ) - Brasil																	
Aperibé (RJ) – Brasil																	
Guarapari (ES) – Brasil																	
Viana (ES) – Brasil																	
Ilhéus (BA) – Brasil																	
Itacaré (BA) – Brasil																	
Maraú (BA) – Brasil																	
Pernambuco – Brasil																	
São Tomé e Príncipe											1						
Kribi – Camarões										1							
Limbe – Camarões									1								
Trinidade e Tobago*			1	2				1								1	
Panamá*			1					1				1	4	1	1	1	1
Porto Rico*		1	1	1			1	1					1	1		1	
Bocas del Toro - Panamá						1											
Limón - Costa Rica	1	1	1	1													
Costa Rica – Pacífico					1												
Jamaica							1	1									
Huimanguillo (TC) - México																	
Huehuetla (PL) - México																	
Arroyo Seco (QT) - México																	
Total	1	2	4	4	1	1	2	4	1	1	1	1	5	2	1	3	1

Tabela VII (conclusão). Distribuição dos haplótipos identificados nos 234 espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) analisados. Dn: diversidade nucleotídica. BA: Bahia; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PL: Puebla; TC: Tabasco e QT: Querétaro.

Localidades	**Haplótipos**					**N**	**Dn**
	50-55	**56-182**	**183**	**184-186**	**187-189**		
Ilhabela (SP) – Brasil						5	0,05415 +/- 0,03915
São Sebastião (SP) - Brasil						3	0,04512 +/- 0,04050
Paraty (RJ) – Brasil						4	0,06204 +/- 0,04715
Cambiasca (RJ) - Brasil						5	0,05076 +/- 0,03707
São Fidélis (RJ) - Brasil						1	0,00000 +/- 0,00000
Aperibé (RJ) – Brasil						4	0,05358 +/- 0,04155
Guarapari (ES) – Brasil						1	0,00000 +/- 0,00000
Viana (ES) – Brasil						1	0,00000 +/- 0,00000
Ilhéus (BA) – Brasil						5	0,03046 +/- 0,02445
Itacaré (BA) – Brasil						6	0,04963 +/- 0,03483
Maraú (BA) – Brasil						5	0,02369 +/- 0,02015
Pernambuco – Brasil						1	0,00000 +/- 0,00000
São Tomé e Príncipe						1	0,00000 +/- 0,00000
Kribi – Camarões						1	0,00000 +/- 0,00000
Limbe – Camarões						3	0,07896 +/- 0,06599
Trinidade e Tobago*	1					12	0,11844 +/- 0,06741
Panamá*						19	0,08708 +/- 0,04932
Porto Rico*		1				140	0,14401 +/- 0,07416
Bocas del Toro - Panamá						1	0,00000 +/- 0,00000
Limón - Costa Rica						6	0,13311 +/- 0,08341
Costa Rica – Pacífico						1	0,00000 +/- 0,00000
Jamaica						2	0,08460 +/- 0,09268
Huimanguillo (TC) - México					1	3	0,18049 +/- 0,14189
Huehuetla (PL) - México				1		3	0,06768 +/- 0,05752
Arroyo Seco (QT) - México			1			1	0,00000 +/- 0,00000
Total	1	1	1	1	1	234	0,18024 +/- 0,09114

Tabela VII: Resultados das análises de variância molecular (AMOVA) realizadas com espécimes de *Atya scabra* (Leach, 1816) provenientes de diversas populações. *Valores significativos, P < 0,05.

Estruturação	Fonte de variação	%	Índice de Fixação (FST)	P
Ausente	Entre localidades	42,73	0,427	0.00000*
	Dentro das localidades	57,26		
Grupos Geográficos				
México	Entre grupos	59,89		
África	Entre localidades	-3,04	0,568	0.00000*
Brasil	Dentro das localidades	43,14		
Caribe				
Grupos Genéticos				
México	Entre grupos	66,89		
África	Entre localidades	-0,82	0,660	0.00000*
Brasil + Caribe	Dentro das localidades	33,92		
Caribe				

Discussão

Taxonomia molecular

Na revisão morfológica e minuciosa do gênero *Atya* realizada por HOBBS & HART (1982), *A. scabra* foi reconhecida como uma espécie de *status* taxonômico válido, a partir de espécies de distintas localidades que foram sinonimizadas. Apesar disso, foi documentada uma grande variabilidade morfológica, muito embora sem padrões geográficos claros. As análises moleculares realizadas no presente estudo, com os genes mitocondriais 16S e COI, corroboraram a validade taxonômica da espécie nas áreas de ocorrência analisadas que abrangeram quase toda a totalidade de distribuição descrita para a espécie.

Existem diferentes métodos para se delimitar ou definir uma espécie (SITES & MARSHALL, 2003) e o uso de técnicas distintas em complementaridade aperfeiçoa a acurácia das conclusões (HILLIS, 1987; HOŁYŃSKI, 2010). Dessa forma, a utilização de técnicas moleculares em acréscimo aos dados morfológicos é bastante útil na tentativa de resolver problemas taxonômicos e filogenéticos (MANTELATTO *et al*., 2007; BRACKEN-GRISSOM *et al.*, 2012; NEGRI *et al.*, 2012; PILEGGI & MANTELATTO, 2012**)**, embora não seja infalível (PAGE & HUGHES, 2011). Assim, o presente estudo confirma a ideia de que sempre que possível/viável, deve-se buscar a multidisciplinariedade com estudos fisiológicos, comportamentais, reprodutivos, ecológicos, de acasalamento, de forma complementar (KNOWLTON, 1986; HILLIS, 1987; BICKFORD *et al.*, 2006).

O valor mais alto de divergência intra-específica para o gene 16S ocorreu entre espécimes do Brasil e do México (0,6%), contudo a distância em relação às outras espécies do gênero foi de 3,7 a 4,6%, e a distância em relação a outros gêneros ficou

acima de 15% (Tabela III). Essa nítida separação entre espécies e gêneros, visualizada com os grupos externos escolhidos, demonstra a validade do emprego do gene 16S como ferramenta de análise de variação interespecífica ou intergenérica, ao ser um gene de mutações mais lentas em relação ao COI (MORITZ *et al.*, 1987; SCHUBART *et al.*, 2000; SCHUBART & HUBER, 2006). Além disso, todas as sequências de diversas localidades analisadas formaram um clado separado na análise de Maximum-Likelihood (Figura 4), corroborando a análise de distância e evidenciando a monofilia da espécie.

Os valores de divergência intra-específica e interespecífica podem variar muito em diferentes grupos de crustáceos, fazendo do valor de *gap* interespecífico variável e relativo aos grupos em que se esteja estudando (COSTA *et al.*, 2007; ROBE *et al.*, 2012). O gene COI apresenta uma variação grande entre diferentes grupos de crustáceos, de 0 a 2,5% dentro de espécies e 4,9 a 23,6% entre espécies (COSTA *et al.*, 2007). A divergência encontrada dentro da espécie *A. scabra*, que variou de 0 a 8,6%, é acima da média citada, contudo é bastante inferior a distância interespecífica (12,8 a 17,4%) encontrada no grupo estudado (Tabela V), portanto, em relação a variação dentro do gênero *Atya*, a análise de distância do gene COI não separa *A. scabra* em duas ou mais espécies, assim como a análise de Maximum-Likelihood realizada que também evidenciou, com alto valor de *bootstrap*, o clado formado por todos os espécimes de *A. scabra* analisados (Figura 5).

O resultado obtido com o gene COI mostrou claramente a variação intra-específica dentro e entre as localidades, separando-as em quatro grupos: Brasil + Caribe, Caribe, África e México. Porém, embora tenham sido encontradas (1) alta estruturação genética (valores de FST altos) (Tabela VII); (2) separação dos grupos nas análises de Maximum-Likelihood (Figura 5); (3) subdivisão em grupos na rede de haplótipos (Figura 6) corroborada pela AMOVA e (4) grande variabilidade morfológica

documentada para a espécie (HOBBS & HART, 1982), no nível de resolução dos genes empregados nas análises desse estudo, não foi encontrada divergência que sustente a existência de espécies crípticas ao longo da distribuição de *A. scabra*.

Marcadores genéticos mais variáveis, ou seja, sensíveis a divergências genéticas menores, como microssatélites ou região mitocondrial *D-loop*, teriam a capacidade de explicitar estruturações e divergências não possíveis com os genes aqui empregados (SLATKIN, 1985b; BENZIE, 1998; SCHLÖTTERER, 2004). Apesar disso, os genes mitocondriais 16S e COI tem sido bastante eficientes em identificar a existência de espécies crípticas entre crustáceos decápodes (SANTOS *et al.*, 2003; PAGE *et al.*, 2005; COOK *et al.*, 2006; GUSMÃO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; PUILLANDRE *et al.*, 2011; TOURINHO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013), e são tidos como eficazes marcadores para testar validade de espécies (SCHUBART *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2007; MCLAY *et al.*, 2011; OCAMPO *et al.*, 2013). De forma que, embora as populações de *A. scabra* estejam estruturadas, evidências morfológicas (HOBBS & HART, 1982) e moleculares (presente estudo) não sustentam a existência de unidades evolutivas isoladas reprodutivamente.

Um dado que poderia levantar evidência contrária à monofilia da espécie, seriam possíveis diferenças ecológicas, como o tipo de ambiente ocupado ou diferentes hábitos e modo de vida, de populações da espécie em diferentes localidades ao longo da distribuição geográfica, pois nesse caso é possível que exista divergência genética mais acentuada (GUSMÃO *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2013). Contudo, nos trabalhos realizados no sul do estado de Tamaulipas, México (DARNEL, 1956), em Veracruz, México (VILLALOBOS, 1943), em localidades no mar do Caribe (CHACE & HOBBS, 1969; FRYER 1977; HERRERA-CORREAL *et al.*, 2013), no Brasil (GALVÃO & BUENO, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2010) e na África (HOLTHUIS, 1966), mostraram

que os espécimes adultos são coletados no mesmo tipo de ambientes: riachos ou córregos pouco profundos (rasos), com fluxo de água rápido, nos quais existem substrato rochoso, onde os espécimes são encontrados abrigados sob as rochas (HOBBS & HART, 1982). Portanto, em uma análise superficial, isto é, baseada nas descrições dos ambientes de coleta, e não em estudos aprofundados, não é notado nenhum elemento que conjecture alguma variação do ambiente ocupado em diferentes localidades.

A coloração dos indivíduos, embora exija cautela, poderia ser utilizada como ferramenta taxonômica adicional em testes de diferenças entre espécies, evidentemente nas quais a morfologia ou outras ferramentas taxonômicas necessitam de maior suporte (KNOWLTON, 1986; NEGRI *et al.*, 2012). CHACE & HOBBS (1969) fizeram a descrição mais detalhada para *A. scabra* no que tange a coloração. Examinaram e descreveram minunciosamente espécimes da Dominica, detalhando a coloração, distribuição dos cromatóforos e bandas (faixas). No entanto, seriam preciso estudos similares para efeito de comparação com distintas localidades ao longo da ampla distribuição da espécie. Porém, a necessidade de se examinar material fresco dificulta esse tipo de estudo, evidentemente de forma comparativa ao longo de uma distribuição tão ampla (KNOWLTON, 1986). Ademais, mesmo que evidenciada diferenças de coloração claras, essas *per si* não contituiriam suporte para justifcar uma divisão de espécies, tendo em vista que a variação de coloração é bastante complexa, podendo variar de acordo com a fase de vida, maturidade, sexo, ambiente ocupados entre outros (BAUER, 2004). Assim, seriam necessárias pesquisas com diferentes ferramentas taxonômicas que apresentassem resultados congruentes com tal separação (KNOWLTON, 1986; HILLIS, 1987).

Grupos de indivíduos localizados em diferentes áreas, caso documentado que apresentassem períodos reprodutivos distintos, poderia gerar evidências de algum tipo de isolamento reprodutivo ou ao menos estruturação maior (TSUKAGOSHI *et al.*, 2011). Contudo estudos realizados com *A. scabra* sugerem que em diferentes localidades estudadas (México, mar do Caribe e Brasil) parece haver reprodução ao longo do ano todo (VILLALOBOS, 1943; DARNEL, 1956; HOBBS & HART, 1982; GALVÃO & BUENO, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2010; HERRERA-CORREAL *et al.*, 2013) e, portanto, não há indícios de diferentes espécies descritas sob o mesmo nome de acordo com esses dados.

Um grupo que se destacou devido à divergência genética relativamente elevada foi o do México, que englobou as três localidades mexicanas analisadas. Contudo, conforme já discutido nessa sessão, com os dados disponíveis não se justifica a existência de uma espécie distinta isolada no Golfo do México. Todavia revela uma área na qual novos estudos genéticos, com maior número de localidades amostradas, n amostral superior e utilizando diferentes marcadores genéticos, bem como o emprego de distintas técnicas taxonômicas, como morfológicas, requerem ser conduzidos (SLATKIN, 1985a; KNOWLTON, 1986; HILLIS, 1987). Essa característica que estudos sobre variabilidade genética apresentam, de evidenciar grupos geneticamente divergentes não notadas por estudos morfológicos anteriormente (SANTOS *et al.*, 2003), promovem a condução de novas pesquisas mais focadas no grupo salientado, que podem levar a diagnose de caracteres morfológicos que suportem a divisão, os quais usados conjuntamente podem sustentar revisões taxonômicas e auxiliar no entendimento da distribuição biogeográfica de espécies (KNOWLTON, 1986; SCHUBART *et al.*, 2000; MORITZ *et al.*, 2007; TOURINHO *et al.*, 2012).

No que tange o emprego da técnica do *DNA Barcoding*, esse estudo serve como exemplo das dificuldades encontradas no uso de *primers* específicos, pois não foi obtido sucesso na amplificação do gene COI com marcadores universais em *A. scabra.* Dessa forma, foi preciso utilizar *primers* específicos para o gênero, os quais amplificam regiões distintas do gene COI, que não a especificada para o *Barcoding*. Para possibilitar uma comparação efetiva com bancos de dados é muito importante que os fragmentos amplificados sejam os mesmos (SCHLÖTTERER, 2004; COSTA *et al.*, 2007). Com isso, não é possível conduzir estudos comparativos com outros táxons devido à incongruência das regiões sequenciadas, que não foi àquela sugerida para a técnica do *Barcoding* (COSTA *et al.*, 2007).

Tal adversidade não é exclusividade do táxon desse trabalho e se revela um desafio para as técnicas moleculares atuais (ASMYHR & COOPER, 2012). A utilização de *primers* específicos auxilia na amplificação do gene pretendido, contudo prejudica a comparação das sequências entre táxons conforme discutido (BUCKLIN & ALLEN, 2004**).** Assim sendo, o uso de técnicas moleculares com marcadores genéticos e o *DNA barcoding* é proveitoso em diversos casos (PUILLANDRE *et al.*, 2011; NEGRI *et al.*, 2012; BRACKEN-GRISSOM *et al.*, 2012) embora existam questões a serem aperfeiçoadas (HOŁYŃSKI, 2010).

Finalmente, a dificuldade de obtenção de espécimes frescos das diferentes localidades por meio de coleta, notoriamente no caso de *A. scabra* que tem uma abrangência conspícua, demanda a obtenção desses nos lotes de coleções zoológicas, na maioria das vezes com indivíduos coletados há muito tempo, que foram sujeitos a técnicas de fixação de material biológico com formol. Com o tempo de preservação, o formol fica ácido, e pode fragmentar e desnaturar o DNA (BUCKLIN & ALLEN, 2004) e, com isso, dificultar a amplificação (SCHANDER & HALANYCH, 2003). Diversas

amostras de tecidos, proveniente de diversas localidades (África: Libéria, Nigéria, Cabo Verde; Caribe: Nicarágua, Dominica, Guadalupe e Brasil: Rio Grande do Norte, Alagoas, Santa Catarina, Rio Grande do Sul), obtidas para amplificação não resultaram em sequências devido ao insucesso da amplificação: esses tecidos eram advindos de coleções zoológicas, com provável preservação em formol antigas. Embora o aperfeiçoamento dos protocolos de extração tenham tido relativo sucesso em moderar esse empecilho (ZUCCON *et al*., 2012), a aplicação da preservação em álcool de material futuramente coletado seria de grande auxílio para viabilizar estudos moleculares **(**BUCKLIN & ALLEN, 2004).

Estruturação genética e dispersão larval

Conforme mencionado, as análises realizadas com o gene COI evidenciaram uma estruturação genética forte (FST 0,427) e distinguiram quatro grupos genéticos distintos: Brasil + Caribe, Caribe, África e México corroborados pela análise de variância molecular (AMOVA). Apesar disso, a existência de haplótipos compartilhados entre diversas localidades brasileiras, entre diferentes localidades do Caribe e entre localidades brasileiras e do mar do Caribe sugerem a existência de fluxo gênico constante, ou ao menos recente, que poderiam ocorrer ou ter ocorrido por meio de eventos de colonização/re-colonização (SLATKIN, 1985b; 1987; BENZIE, 1998; COOK *et al*., 2009).

A proximidade genética e ausência de estruturação entre localidades do mar do Caribe (Panamá, Trinidade e Tobago e Porto Rico) já havia sido reportada em estudos que sugeriram a dispersão de larvas de animais anfídromos, entre eles *A. scabra*, via correntes oceânicas nessa região (COOK *et al*., 2009; 2010; PAGE *et al.*, 2013). No presente estudo foram encontrados haplótipos compartilhados que sugerem também a

conectividade da Jamaica e Costa Rica com essas outras localidades, o que corrobora e expande a capacidade dispersiva insular anteriormente sugerida para o mar do Caribe. O único indivíduo de uma localidade da vertente Pacífica da América (Costa Rica) teve seu haplótipo incluso no grupo Caribe, e, segundo HOBBS & HART (1982), *A. scabra* teria atravessado a divisa continental no Panamá. A inclusão desse haplótipo no grupo de localidades do Atlântico sugere que tal evento teria ocorrido recentemente.

Entre as localidades brasileiras analisadas também foram encontradas evidências de fluxo gênico, pois diversos haplótipos foram compartilhados, incluindo localidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco. Áreas continentais não apresentam diferença na possibilidade de dispersão via larvas planctônicas do que a mais frequentemente reportada em ilhas ou entre ilhas (DENNENMOSER *et al.*, 2010; COOK *et al*., 2012; LORD *et al.*, 2012). Tendo em vista a proximidade genética encontrada entre essas localidades ao longo da costa brasileira, a dispersão larval também deve ocorrer nessa área continental, semelhantemente ao reportado em regiões insulares do Caribe (COOK *et al*., 2012)

Além disso, os resultados obtidos sugerem que a capacidade de dispersão larval de *A. scabra* é mais notória do que já sugerido, tendo em vista que entre localidades separadas por centenas de quilômetros, como sudeste brasileiro e o Mar do Caribe, também foram encontrados haplótipos compartilhados, além de vários haplótipos de localidades do mar do Caribe que ficaram agrupados com as localidades brasileiras. No estudo de PAGE *et al.* (2008) foi sugerida a grande importância que essa migração de longa distância teria tido na colonização ao longo da evolução dos camarões atyídeos. Contudo, tendo em vista a atual proximidade genética aqui reportada, é possível que essa dispersão ainda esteja ocorrendo ou tenha ocorrido até um passado recente, pois

caso contrário era de se esperar uma maior divergência genética bem como ausência de haplótipos compartilhados (SLATKIN, 1987; PAGE *et al.*, 2008).

Os haplótipos compartilhados por diversos indivíduos de localidades distintas (como o H-1) que formam um padrão na rede de haplótipos em forma de estrela, isso é, vários haplótipos proximamente relacionados (geralmente com apenas um passo mutacional de diferença) no entorno desse haplótipo central amplamente compartilhado, sugerem expansões populacionais recentes e podem indicar capacidade dispersiva entre as localidades (SLATKIN, 1985a; COOK *et al.*, 2008a).

A descontinuidade genética entre as regiões da costa do Brasil e do mar do Caribe foi documentada para duas espécies de crustáceos marinhos, que foram estruturados em populações distintas entre as quais não há indícios de fluxo gênico (TEROSSI & MANTELATTO, 2012; TOURINHO *et al.*, 2012). Segundo os autores dos estudos citados, as larvas não seriam capazes de transpor uma barreira formada pela foz do Rio Amazonas, que desemboca no norte do Brasil (entre os estados do Amapá e Pará), pois o grande volume de água que desemboca do rio alteraria a salinidade da água naquela região. Contudo, essa barreira geográfica não deve ser significante para *A. scabra* tendo em vista o presente estudo, bem como não foi capaz de estruturar populações de *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann, 1836), que também é uma espécie anfídroma (ROSSI & MANTELATTO, 2013).

O comportamento anfídromo é considerado responsável pelo padrão de distribuição com alcance tão grande por espécies com modo de vida anfídromo (BENSTEAD *et al.*, 2000; BAUER, 2013) e a dispersão larval tem sido sugerida como de grande importância na diminuição ou até mesmo eliminação de estruturação genética entre distantes localidades (PAGE *et al.*, 2005; 2008; CRANDALL *et al.*, 2010; LORD

et al., 2012; BAUER, 2013). Diante dos resultados seria possível conjecturar que as larvas migrassem entre localidades ao longo da costa oeste do Atlântico, incluindo entre diversas localidades no mar do Caribe, por toda a costa brasileira e, possivelmente, transpondo o oceano atlântico, apesar das grandes distâncias geográficas incluídas nessa suposição. Dispersão larval e homogeneidade genética descobertas de 100 até 2000 km de distância sugerem um alto poder dispersivo das larvas (CRANDALL *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 2012)

Nenhum grupo formado pelas análises moleculares compartilhou haplótipos com o grupo África, tampouco houveram haplótipos compartilhados dentre as localidades que compõem esse grupo. Haja vista a proximidade demonstrada desse grupo com os grupos Caribe e Brasil + Caribe, presume-se que tenha existido fluxo gênico recente, e que as populações existentes nas duas vertentes do Atlântico não estejam reprodutivamente isoladas desde a deriva continental como sugerido por HOBBS & HART (1982), pois nesse caso de alopatria em uma longa escala temporal, esperar-se-ia maior divergência genética (SLATKIN, 1987; PAGE *et al.*, 2008).

A proximidade encontrada entre localidades dos dois lados do oceano Atlântico sugerem que exista algum tipo de conectividade presente, mesmo que não constante, ou ao menos mais recente no tempo do que a separação continental. A própria distribuição de *A. scabra* que ocorre em porções insulares distantes da costa africana e que poderiam funcionar como meio facilitador de conectividade com a América reforçam o argumento (PAGE *et al.*, 2008). Além disso, teria de haver uma estase morfológica muito grande, que tivesse conservado os caracteres morfológicos estudados, pois os próprios HOBBS & HART (1982) não encontraram evidências significativas para sustentar a separação de espécimes de vertentes opostas da costa atlântica.

Ainda, tendo em vista que as localidades geograficamente próximas da África tiveram mais passos mutacionais entre seus haplótipos do que entre um haplótipo africano e algum do grupo Brasil + Caribe ou Caribe e o n amostral pequeno obtido de localidades africanas (cinco espécimes), presume-se que em uma análise com n amostral maior, a qual aumentaria a acurácia do resultado (SLATKIN, 1985a), seria razoável que encontrássemos haplótipos compartilhados entre as localidades africanas, da mesma forma como dessas com localidades do outro lado do Atlântico. Adicionalmente, ampliar a abrangência das localidades africanas amostradas, principalmente com as porções insulares da Guiné Equatorial e ilhas de Cabo Verde, também poderiam levar a tal resultado (PAGE *et al.*, 2008), bem como demonstrar mais claramente que a dispersão transoceânica ocorra, mas com poucos migrantes que de fato se estabelecem, ou também teria deixado de ocorrer mais recentemente, e a divergência teria se iniciado recentemente (SLATKIN, 1987).

A produção de ovos pequenos é tida como um indicativo de longa duração do estágio larval em camarões carídeos (BAUER, 2004; 2011b), e, por conseguinte, estaria indiretamente relacionado à capacidade dessas larvas atingirem longínquas localidades (HOAREAU *et al.*, 2007; TSUKAGOSHI *et al.*, 2011). Porém, diversos outros fatores podem regular tal característica (ANGER *et al.*, 2002) e, portanto, o tempo de duração larval não necessariamente é um fator promissor de estruturação genética, apesar das relações positivas em certos táxons (SLATKIN, 1987; DENNENMOSER *et al.*, 2010). A produção de ovos pequenos está associada geralmente com um aumento na quantidade de ovos produzidos (BAUER, 2013). Em *A. scabra* foram registrados em diferente trabalhos a produção máxima de 8.907 (ALMEIDA *et al.*, 2010), 10.000 (CRUZ-SOLTERO & ALSTON, 1992) e 19.250 (HERRERA-CORREAL *et al.*, 2013) ovos pequenos por fêmea ovígera (ABRUNHOSA & MOURA, 1988), assim, por mais

improvável que pareça o sucesso em dispersões de longa distância, o grande números de larvas liberadas aumentam a probabilidade de pelo menos uma minoria ter sucesso em completar o desenvolvimento e encontrar um hábitat apropriado no qual será recrutada.

São documentados 10 estágios larvais em *A. scabra*, que compreenderam 53 dias de desenvolvimento em laboratório (ABRUNHOSA & MOURA, 1988). Esse período de tempo, de acordo com a velocidade das correntes marinhas atuantes, que podem variar sazonalmente e por eventos estocásticos, pode ser suficiente para que longas distâncias sejam atingidas. Por exemplo, CRANDALL *et al.* (2010) calcularam que em 50 dias, uma larva em desenvolvimento sendo carregada por correntes, poderia transpor 850km de distância. Por conta disso, quando consideramos períodos mais longos de desenvolvimento larval em águas marinhas, existe o potencial de longas distâncias serem percorridas, e, próximo ao fim desses estágios larvais, a migração ativa em direção à foz de algum rio ou córrego, caso encontrado um ambiente apropriado, se daria (COOK *et al*., 2010; CRANDALL *et al.*, 2010; BAUER, 2011a; 2011b). Desenvolvimento larval longo é vantajoso em dispersões extensivas e podem criar maiores conectividades e menores estruturações populacionais (COWEN *et al.*, 2006; HOAREAU *et al.* ,2007), ou seja, duração pelágica estendida somada a estruturação genética baixa são indícios de dispersão realizada (LORD *et al.*, 2012), e os resultados encontrados no presente estudo sugerem que esse seja o caso de *A. scabra*.

Adversativamente, em alguns casos, foi observada a ocorrência do fenômeno de retenção larval, que consiste no desenvolvimento larval ocorrer no próprio estuário, pois as condições salobras ali presentes já desencadeariam as metamorfoses larvais (ABRUNHOSA & MOURA, 1988; BENSTEAD *et al.*, 2000). Caso esse processo fosse majoritário ou mais comum em *A. scabra*, deveriam ter sido encontrados resultados com subdivisões genéticas entre qualquer escala espacial de distância, entre ilhas ou até

mesmo entre rios de uma mesma ilha, pois os juvenis seriam recrutados no mesmo rio em que eclodiram (COOK *et al*., 2009). Contudo estudos que mostram ausência de estruturação ou grande afinidade genética entre corpos d'água distintos sugerem que as larvas dessa espécie devem apresentar ao menos algum nível de escoamento para o mar (COOK *et al*., 2008a; 2009; 2010; 2012; PAGE *et al.*, 2013; presente estudo) o que também foi demonstrado para outros animais anfídromos (COOK *et al*., 2010; CRANDALL *et al.*, 2010; DENNENMOSER *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 2012).

Além disso, experimentos com larvas de *A. scabra* demonstraram uma alta taxa de mortalidade larval em salinidades semelhantes à de regiões salobras de estuário, conforme a salinidade foi aumentada, próxima dos 30-35 (média de água salgada marinha) a taxa de mortalidade caiu, e a taxa de sobrevivência das larvas a partir de 30 partes por mil atingiu os 100%, o que sugere o ambiente marinho como ambiente de máximo aproveitamento (CRUZ-SOLTERO & ALSTON, 1992).

Pouca quantidade de fluxo gênico poderia ser capaz de homogeneizar o DNAmt de diferentes populações, não havendo necessidade de um fluxo gênico amplo e constante, que poderia ocorrer de uma forma mais ocasional e já surtir efeito, seja na homogeneização de divergências genéticas ou na possibilidade de novas ou sucessivas colonizações (COOK *et al*., 2009; CRANDALL *et al.*, 2010). Os padrões de circulação das correntes oceânicas são bastante complexos, estão sujeitos a condições climáticas, que podem intervir nos fatores físicos como velocidade ou temperatura, assim um fluxo gênico constante por longos períodos entre áreas geográficas muito distantes deve ser incomum (CRANDALL *et al.*, 2010), mas poderia ser o suficiente para ocorrência de haplótipos compartilhados e afinidades genéticas substanciais (COOK *et al*., 2009).

Uma forma de otimizar a probabilidade de sucesso na dispersão diante um cenário complexo de variações sazonais ou até estocásticas, seria a liberação de larvas extensamente ao longo de todo o ano, isso auxiliaria a diminuir ou eliminar barreiras ao fluxo gênico**,** pois independente dos períodos que se tornassem favoráveis à dispersão, sempre haveriam larvas sendo liberadas e que poderiam aproveitar o momento para realizar a migração (HOHENLOHE, 2004). Em um estudo populacional com *A. scabra* realizado em Ilhéus (Bahia, Brasil) foram encontradas fêmeas ovígeras ao longo do ano todo, o que indica liberação larval ininterruptamente (ALMEIDA *et al.*, 2010), outros estudos também sugeriram liberação de larvas constante da espécie, embora não tenham dados completos de todo o período de um ano (VILLALOBOS, 1943; DARNEL, 1956; LORÁN-NÚÑEZ *et al.*, 2009). Além disso, tem sido atribuído taxa reprodutiva mais elevada em espécies anfídromas nas épocas chuvosas, nas quais o volume de água dos rios aumenta e favorecerem o escoamento das larvas para o oceano (BAUER, 2011a; 2013; TSUKAGOSHI *et al.*, 2011).

Espécies de água doce com modo de vida anfídromo e espécies marinhas com estágios larvais pelágicos apresentam maiores habilidades de dispersão e menor grau de estruturação genética do que espécies dulcícolas restritas ou marinhas com baixa mobilidade (potencialmente) (COOK *et al*., 2008b; COOK *et al.*, 2009; CRANDALL *et al.*, 2010). Com efeito, espécies diádromas podem ter dispersão marinha realizada maior do que a de algumas espécies marinhas (COOK *et al.*, 2009). Outro dado que sustenta a fase larval marinha como responsável pela ausência de estruturação/divergência genética profunda, é a analise de espécies que têm o seu desenvolvimento completo dependente de hábitats de água doce, um estudo filogeográfico realizado evidenciou uma estruturação mais marcante nesse caso, o que sugere uma progressiva divergência, não encontrada nas espécies anfídromas da mesma localidade estudada (COOK *et al.*,

2008a; 2008b; 2009). Dessa forma, a existência de desenvolvimento direto, ou ausência de desenvolvimento larval marinho proporciona estruturação genética ou pelo menos uma conectividade menos evidente do que em espécies anfídromas (COOK *et al.*, 2008b; VERGAMINI *et al.*, 2011; BAUER, 2013).

Alternativamente, correntes marinhas podem gerar dificuldades à dispersão larval pelágica, e levar para mar aberto larvas que se perderiam (não seriam recrutadas por não encontrarem ambientes apropriados) e morreriam (WEESE *et al.*, 2012). Nesse caso, as correntes funcionam como barreiras biogeográficas em detrimento de atuarem como fontes dispersoras (COOK *et al.*, 2012). As correntes oceânicas são consideradas, na maioria dos casos, como meios que favorecem mais do que constringem inter-conectividade de populações e, assim, promovem homogeneização genética em grandes escalas geográfica (BAEZA & FUENTES, 2013)**.** Porém, irrefutavelmente, são necessárias correntes que favoreçam o transporte larval para que a colonização de novas localidades ou a manutenção de fluxo gênico entre localidades já ocupadas ocorram (CRANDALL *et al.*, 2010).

Ultimamente, o fato de larvas de espécies anfídromas serem encontradas em ambientes marinhos (DENNENMOSER *et al.*, 2010), bem como indivíduos juvenis também (PAGE *et al.*, 2013), ademais todos estudos aqui citados e discutidos que demonstram ausência de estruturação genética em distintas localidades (com histórias geológicas particulares) e em escalas geográficas de distância diferentes, indicam dispersão planctônica ao menos ocasional, mas provavelmente de grande importância na história de colonizações e expansões da área de ocorrência das espécies, igualmente de manutenção de fluxo gênico e possível panmixia entre essas localidades (PAGE *et al.*, 2005; PAGE *et al.*, 2008).

Isolamento do Golfo do México

As três localidades do México incluídas nas análises apresentaram, de maneira notória, grande divergência genética em relação às demais (não mexicanas). Quando comparadas todas as demais localidades analisadas com as que constituem o grupo México, observam-se as maiores divergências genéticas de COI, que variaram de 5,9 a 8,6% e, embora essa distância, como já afirmado, é inferior ao *gap* interespecífico (acima de 12%), ainda assim é significativa e requer atenção. Portanto, apesar da monofilia da espécie, as análises evidenciaram essa separação de um sub-grupo.

O Golfo do México é um mar semi-aberto, conectado a oeste ao Oceano Atlântico, pelo estreito da Flórida, e ao sul conectado ao mar do Caribe pelo canal de Yucatán (OEY *et al.*, 2005) (Figura 7). Possivelmente exista algum fator ou combinação de fatores (geográfico, ecológico, climático, oceanográfico, entre outros) agindo como barreira zoogeográfica para a dispersão larval que poderia adentrar ao golfo. Contudo, é um grande desafio compreender toda a complexidade das correntes e hidrografia do golfo mexicano (OEY *et al.*, 2005; TSUKAGOSHI *et al.*, 2011), bem como os diversos outros fatores que poderiam estar agindo ou ter agido historicamente (BAEZA & FUENTES, 2013).

Tendo em vista que atualmente existe essa divergência marcante, é possível que a barreira existente, independente do que a constitua exatamente, seja contemporânea também. Pois, embora uma formação geológica histórica com particularidades pudesse ter representado a distribuição e separação evidenciadas no presente trabalho, caso as barreiras de outrora não estivessem mais atuantes, era-se de esperar que migrações contemporâneas ocorressem, e mesmos que ocasionais, contribuíssem com uma maior homogeneidade genética (COOK *et al.*, 2009), a menos que as barreiras de outrora

tivessem existido por tempo suficiente para ter ocorrido o isolamento reprodutivo, ou seja a especiação. Porém, como já discutido não existem evidências para isso.

Presumivelmente o resultado encontrado não se restrinja simplesmente a grande distância continental existente entre o mar do Caribe e o México, a qual, como argumentado anteriormente, não seria capaz de restringir a dispersão larval *per si* (CRANDALL *et al.*, 2010; DENNENMOSER *et al.*, 2010; COOK *et al*., 2012; LORD *et al.*, 2012; PAGE *et al.*, 2013). É admissível que uma hidrodinâmica distinta de correntes dentro do Golfo do México poderia funcionar como uma barreira geográfica à migração. No Japão, foi encontrada divergência genética entre populações do camarão atyídeo *Caridina rubella* Fujino and Shokita, 1975 e sugerido que a existência de correntes oceânicas fortes na região dispersaria as larvas para longe das ilhas, em direção ao oceano, o que não permitia fluxo gênico entre os sistemas de água doce em diferentes localidades analisados (WEESE *et al.*, 2012).

De fato, a *Loop Current*, uma corrente marinha do Golfo do México, tem demonstrado participação ímpar no contexto hidrodinâmico da área e é considerada uma propriedade dominante na circulação no Golfo do México oriental. Essa se origina no canal de Yucatán, região marinha entre Cuba e a península de Yucatán (México) e vai em direção ao estreito da Flórida (Figura 7), o *loop* realizado pela corrente é um limite ocidental dentro do golfo, pois internamente ele apresenta correntes com velocidades intensas, e variações ocorrem conforme ele se junta episodicamente com anéis de núcleo quente que se formam na região (OEY *et al.*, 2005). Correntes oceânicas, como afirmado, podem variar e convergir de tal forma que deixe de favorecer e passe a dificultar ou restringir a dispersão larval (HOHENLOHE, 2004**;** CRANDALL *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 2012).

Segundo SCHMITZ JR. *et al.* (2005) ao longo da margem da *Loop Current* são formados movimentos circulares de água contra a direção principal da corrente (vórtex), os quais são determinantes na retenção e no recrutamento de peixes que ocorrem na Flórida. Da mesma forma que ela pode reter as larvas, não permitindo a entrada mais distante no Golfo do México, efeitos semelhantes, inversamente, poderiam impedir ou reduzir a probabilidade de larvas vindas do mar do Caribe pela Corrente de Yucatán Atingirem os estuários de córregos e rios existentes na costa leste mexicana ou sul e sudeste dos Estados Unidos, pois em ambos os casos a corrente agiria como barreira, por não ser transposta pelas larvas.

Conforme salientado, em espécies anfídromas a retenção larval no estuário já foi documentada (BENSTEAD *et al.*, 2000) e, apesar das evidências já discutidas que suportam o desenvolvimento larval de *A. scabra* ocorrer em regiões marinhas, podemos conjecturar que alguma razão levasse os indivíduos das localidades mexicanas terem o desenvolvimento larval retido ao estuário dos rios em que ocorrem. Além disso, mesmo que esse desenvolvimento transcorresse em áreas marinhas, as larvas poderiam estar retidas por uma combinação de fatores geográficos e hidrográficos ao oeste do Golfo, de forma semelhante ao discutido por SCHMITZ JR. *et al.* (2005) na retenção e recrutamento de peixes e, assim, haveria dispersão apenas entre as áreas mexicanas.

Existe conectividade entre recifes de corais dentro do Golfo do México, ou seja, a migração larval ocorre entre eles (SCHMITZ JR. *et al.*, 2005). Amostras de sedimentos e poluentes do Rio Mississipi encontradas ao longo de regiões do Golfo do México até a Península de Yucatán também demonstram essa conectividade interna (SCHMITZ JR. *et al.*, 2005). Contudo a complexidade das formações hidrológicas ali presentes, não evidenciam conectividade a oeste da *Loop Current*, que como afirmado parece ser um limite oeste no golfo (OEY *et al.*, 2005).

Um trabalho realizado com o camarão marinho *Palaemon floridanus* Chace, 1942 encontrou forte estruturação genética e rejeitou a panmixia da espécie, que devido à dispersão marinha supostamente apresentaria grande conectividade entre mar do Caribe e Golfo do México. Nesse estudo, embora tenha sido encontrada semelhança genética entre o Panamá (mar do Caribe) com a península da Flórida (Golfo do México), essa foi atribuída à agua de lastro de navios comerciais que operam entre essas localidades, e assim, carregariam as larvas através desse percurso (BAEZA & FUENTES, 2013).

Espécies de recife de coral e de peixes que ocorrem distribuídas ao longo dessas regiões aqui discutidas tiveram a dispersão marinha mapeada, com a finalidade de mensurar sua possibilidade dispersiva, e elas não demonstraram transpor, no Golfo do México, a *Loop Current*, se restringindo a oeste dessa o limite dispersivo mapeado (ROBERTS, 1997). A única conexão encontrada nesse estudo entre mar do Caribe e Golfo do México ficou restrita entre localidades caribenhas com às da Flórida, as quais poderiam ocorrer por não demandar a transcendência dessa corrente, no máximo acompanhar o trajeto natural dela já citado.

Outro fator que poderia dificultar a entrada de larvas do mar do Caribe em direção ao Golfo do México pela Corrente de Yucatán seria o fenômeno da ressurgência que existe sazonalmente na região de Yucatán (Figura 7), que ocorre devido à interação da Corrente de Yucatán com a topografia do fundo do oceano, gerando a ressurgência (MERINO, 1997). Quando esse fenômeno ocorre, diversos fatores físicos, como salinidade, temperatura, disponibilidade de nutrientes, entre outros são alterados e algum desses fatores ou a congruência de mais de um deles poderiam agir como limitantes à dispersão ou à sobrevivência larval, dificultando ou até mesmo impedindo a transposição dessa área pelas larvas (MERINO, 1997).

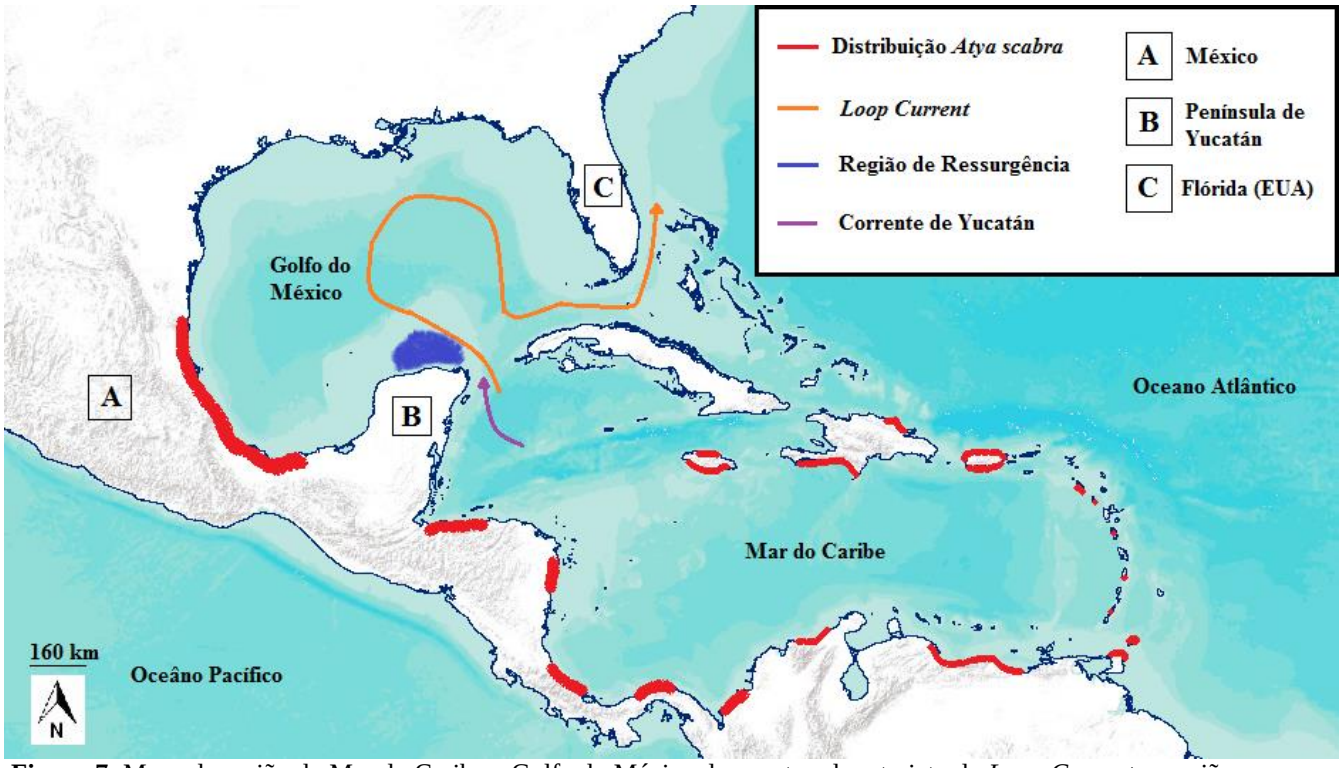

Figura 7: Mapa da região do Mar do Caribe e Golfo do México demonstrando o trajeto da *Loop Current*, a região de ressurgência da Península de Yucatán, a Corrente de Yucatán e as áreas de ocorrência de *Atya scabra* (Leach, 1816) na região. EUA: Estados Unidos da América.

Diante de cenários de longas distâncias a serem transpostas ou fatores geográficos, físicos e hidrológicos a serem superados, a existência de ambientes adjacentes adequados ao recrutamento das larvas poderia favorecer a conquista de novas áreas, conforme PAGE *et al.* (2008) argumentaram que a existência de ilhas entre África e América favoreceriam a transposição do oceano Atlântico. Contudo, não é registrada ocorrência de *A. scabra* nas regiões mais distantes da península de Yucatán. Pode ser que exista a dificuldade de um estabelecimento gradual, entre áreas adjacentes (*stepping-stone*) naquela região, devido aos poucos rios e córregos que desembocam ali (MERINO, 1997). Assim, as larvas teriam que transpor uma distância maior em uma só dispersão e ainda transpor a *Loop Current* para atingir tais localidades em que são encontradas atualmente.

Tendo em vista a distribuição geográfica e intricados padrões de estruturação genética, devem-se levar em consideração acontecimentos contemporâneos somados aos históricos, que juntos, podem determinar padrões complexos de filogeografia de diferentes espécies (BAEZA & FUENTES, 2013). Portanto é bastante complicado inferir uma causa ou combinação de fatores que estabeleçam a divergência aqui encontrada. Porém, devido aos resultados das análises genéticas e estudos morfológicos anteriores corroborarem a existência de uma mesma espécie ao longo de toda a distribuição, incluindo o divergente México, é possível que os fatores aqui discutidos e os inúmeros outros plausíveis sobre a existência presente ou passada, tenham gerado uma barreira geográfica impermeável recentemente, e, portanto, ainda não houve tempo necessário à divergência genética maior e consequente especiação (HENDRY & KINNISON, 2001), resultando em possíveis variações morfológicas, de comportamento ou ecológicas com potencialidade de surgimento (HILLIS, 1987).

Outra alternativa seria que, apesar da complexidade hidrodinâmica, distância geográfica e outras questões discutidas existirem, essas apenas dificultariam o fluxo gênico, não impedindo-o por completo, e assim, uma divergência mais expressiva não teria ocorrido (SLATKIN, 1985a; HENDRY & KINNISON, 2001; COOK *et al.*, 2006). Mudanças ocorridas no passado histórico, como reversões de correntes (CRANDALL *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 2012), regimes oceânicos distintos ou flutuações no nível do mar (MCLAY *et al.*, 2011; LORD *et al.*, 2012) podem ter gerado padrões diferentes de dispersão, os quais permitiram a colonização da região pela espécie, mas não necessariamente uma conectividade extensiva até épocas mais recentes. Barreiras que limitam a dispersão poderiam surgir e desaparecer com o tempo, dificultando a compreensão da estruturação atual (SLATKIN, 1987).

Recentemente um trabalho realizado com a espécie de ermitão *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802), de ocorrência antes tida na América do Sul ao Golfo do México, evidenciou a existência de duas entidades taxonômicas distintas, uma restrita a América do Sul e mar do Caribe e a outra ao Golfo do México (NEGRI *et al.*, 2012). Esse estudo apresenta resultados congruentes com o aqui exposto no que tange algum nível de isolamento do Golfo do México.

Finalmente, embora exista uma estruturação clara em relação ao grupo do México, e uma maior divergência genética daquelas localidades, nenhum tipo de dado, morfológico, genético, ecológico, comportamental ou reprodutivo parece sustentar a existência de duas espécies sob o mesmo nome na classificação atual. Portanto, até o momento, nenhuma evidencia suporta a separação desse sub-grupo mexicano, o qual provavelmente pertence a localidade tipo de *A. scabra*, de uma possível distinta espécie, a qual teria ocorrência no Mar do Caribe, Brasil e África.

Conservação de espécies anfídromas

Conforme descrito, o ciclo de vida de *A. scabra* é anfídromo, isto é, depende da migração longitudinal ao longo do rio ou córrego em ambos os sentidos: da larva em direção à foz e, após o desenvolvimento larval completo, do juvenil a montante (MCDOWAL, 2007; BAUER, 2013). Pelo fato da migração larval em direção ao estuário ser passiva, ela depende do fluxo de água dos córregos, o qual também serve como pista na migração ativa do juvenil em direção à cabeceira dos rios (BAUER, 2011a).

Diversos tipos de alteração de hábitat, ou pressões antrópicas em geral, como construção de barragens ou retirada de água dos córregos, muitas vezes impedem a migração longitudinal de ocorrer, pois as larvas podem não ser escoadas em direção ao

oceano e os juvenis não recebem a pista que precisam para serem recrutados e migrarem para os hábitats de água doce onde irão amadurecer e se reproduzir (BENSTEAD *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2009; BAUER, 2011a; 2013; WEESE *et al.*, 2012).

Levando em consideração que para existir o ciclo de vida completo do organismo a migração longitudinal é essencial, todo tipo de pressão antrópica que interfira nos fluxos dos rios e córregos devem ser considerado como potencial risco (AMARAL *et al.*, 2008; BAUER, 2011b). Além disso, estudos de variabilidade genética em espécies anfídromas têm demonstrado a importância da dispersão larval para a re-colonizarão do mesmo rio, bem como de outros sistemas de água doce, o que propicia a manutenção das possíveis metapopulações (COOK *et al.*, 2009; LORD *et al.*, 2012).

Para *A. scabra* as expansões populacionais e as re-colonizações de hábitat têm demonstrado grande importância (COOK *et al.*, 2008a; 2009). Mais do que isso, se for considerado o grau de conectividade demonstrado entre localidades tão distintas (PAGE *et al.*, 2013; presente estudo), a possibilidade de encontrar ambientes apropriados, com pistas de fluxo de água para o recrutamento dos juvenis, bem como possibilidade da descarga de larvas, são importantes para a manutenção da espécie. A oportunidade das populações expandir e colonizar/re-colonizar é importante pois tende a reduzir a probabilidade de extinção (HENDRY & KINNISON, 2001).

Espécies marinhas que apresentam conexões genéticas entre áreas diferentes demonstram que populações de um local dependem de processos que ocorrem em outras áreas, dessa forma é necessário estratégias de gerenciamento em diversas localidades, pontuais, ou em larga escala abrangendo toda a área que está de alguma forma conectada, o que é uma tarefa difícil tendo em vista que essas escalas de conectividades

ultrapassam limites políticos de nações e exigiriam colaboração integrada (ROBERTS, 1997).

Portanto, devida a condição de preservação da espécie no Brasil (AMARAL *et al.*, 2008; F. MANTELATTO com. pes.), a exploração comercial para alimentação e aquarismo, descrito nas diversas localidades de ocorrência (OLIVEIRA, 1945; VILLALOBOS, 1943; HOBBS & HART, 1982; HOLTHUIS, 1980; CRUZ-SOLTERO & ALSTON, 1992; DE GRAVE *et al.*, 2008; LORÁN-NÚÑEZ *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010) e a grande importância ecológica da espécie em diferentes ecossistemas (BAUER, 2011a; 2013), estratégias que visem obter êxito na conservação de *A. scabra* devem buscar proteção de diferentes regiões ao longo do curso dos rios e córregos, haja vista o ciclo de vida da espécie, bem como de diferentes localidades de ocorrência da espécie, tendo em vista o provável fluxo gênico existente entre essas, e consequente conectividade e interdependência das áreas de ocorrência da espécie.

Conclusão

Os resultados possibilitam concluir que *Atya scabra* é uma espécie taxonomicamente válida ao longo de toda distribuição analisada, que abrangeu praticamente toda a distribuição registrada para a espécie. Dessa forma, a hipótese do trabalho foi rejeitada, pois apesar da ampla distribuição da espécie não existe diferenciação genética ou qualquer outro tipo de evidência para a existência de espécies crípticas ao longo da distribuição analisada. Apesar disso, uma forte estruturação genética foi encontrada e distinguiu quatro grupos: Brasil + Caribe, Caribe, África e México. Contudo, a dispersão larval marinha decorrente do ciclo de vida anfídromo da espécie parece propiciar uma conectividade em larga escala de distâncias, permitindo a possível presença de fluxo gênico recente ou contemporâneo entre localidades do mar do Caribe, do Brasil e de localidades do mar do Caribe com o Brasil. Mais do que isso, a pequena divergência encontrada em relação ao grupo da África em relação ao grupo Caribe e Brasil + Caribe, sugere que deva ter existido conectividade anfi-Atlântica muito posterior à separação continental. Já o grupo do México se encontra mais isolado geneticamente dos demais e, embora não existam evidências sugerindo uma revisão taxonômica, é provável que fatores biogeográficos, históricos ou contemporâneos, tenham atuado ou ainda atuem, dificultando ou impedindo, a dispersão larval para o Golfo do México. Por fim, devido à interconectividade das populações de *A. scabra* e da importância das migrações longitudinais nos córregos e rios, programas de conservação que visem êxito devem ser abrangentes na questão dos fatores a serem levados em consideração, não adiantando ações pontuais, sejam essas em apenas um córrego (devido a possível panmixia entre localidades) ou uma fração do córrego (por conta da migração longitudinal necessária para o ciclo de vida da espécie se completar).

Referências

ABRUNHOSA, F. A. & MOURA, M. G. (1988). O completo desenvolvimento larval do camarão *Atya scabra* (Leach) (Crustacea: Decapoda: Atyidae), cultivado em Laboratóro. **Arquivo Ciências do Mar**, 27: 127-146.

ADAMS, D. C.; BERNS, C. M.; KOZAK K. H. & WIENS J. J. (2009). Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution?. **Proceedings of Royal Society Biological Sciences B**, 276 (1668): 2729-2738.

ALMEIDA, A. O.; MOSSOLIN, E. C. & LUZ, R. J. (2010). Reproductive biology of the freshwater shrimp *Atya scabra* (Leach, 1815) (Crustacea: Atyidae) in Ilhéus, Bahia, Brazil. **Zoological Studies**, 49 (2): 243-252.

AMARAL, A. C. Z.; RIBEIRO, C. V.; MANSUR, M. C. D.; SANTOS, S. B.; AVELAR, W. E. P.; MATTHEWS-CASCON, H.; LEITE, F. P. P.; MELO, G. A. S.; COELHO, P. A.; BUCKUP, G. B.; BUCKUP, L.; VENTURA, C. R. R. & TIAGO, C. G. (2008). Invertebrados aquáticos, 157-293. *In*: Machado A. B. M.; Drummond, G. M. & Paglia, A. P. (Eds.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção** 1.ed. , Brasília, DF : MMA, Belo Horizonte, MG, Fundação Biodiversitas; 1420 p.

ANGER, K.; MOREIRA, G. S. & ISMAEL, D. (2002). Comparative size, biomass, elemental composition (C, N, H), and energy concentration of caridean shrimp eggs. **Invertebrate Reproduction & Development**, 32: 83-93.

ASMYHR, M. G. & COOPER, J. B. (2012). Difficulties barcoding in the dark: the case of crustacean stygofauna from eastern Australia. **Invertebrate Systematics**, 26: 583-591.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; MARTIN BALL, R.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A. & SAUNDERS, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 489-522.

BAEZA, J. A. & FUENTES, M. S. (2013). Phylogeography of the shrimp *Palaemon floridanus* (Crustacea: Caridea: Palaemonidae): a partial test of meta-population genetic structure in the wider Caribbean. **Marine Ecology**, 34: 381-393.

BANDELT, H. J.; FOSTER, P. & ROHL, A. (1999). Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16: 37-48.

BAUER, R. T. (2004). **Remarkable Shrimps: Natural History and Adaptations of the Carideans**. University of Okalahoma Press, Norman, 316 p.

BAUER, R. T. (2011a). Amphidromy and migrations of freshwater shrimps. II. Delivery of hatching larvae to the sea, return juvenile upstream migration, and human impacts. *In*: A. Asakura (Ed.). **New Frontiers in Crustacean Biology**. Proceedings of the TCS Summer Meeting, Tokyo, 20-24 September 2009. Brill, Leiden, The Netherlands, 157-168.

BAUER, R. T. (2011b). Amphidromy and migrations of freshwater shrimps. I. Costs, benefits, evolutionary origins, and an unusual case of amphidromy. *In*: A. Asakura (Ed.). **New Frontiers in Crustacean Biology**. Proceedings of the TCS Summer Meeting, Tokyo, 20-24 September 2009. Brill, Leiden, The Netherlands, 145-156.

BAUER, R. T. (2013). Amphidromy in shrimps: a life cycle between rivers and the sea. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 41 (4): 633-650.

BENSTEAD, J. P., MARCH, J. G., & PRINGLE, C. M. (2000). Estuarine larval development and upstream post-larval migration of freshwater shrimps in two tropical rivers of Puerto Rico. **Biotropica**, 32: 545-548.

BENZIE, J. A. H. (1998). Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography. *In*: Hall, R. & Holloway, J. D.. **Biogeography and Geological Evolution of SE Asia**. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 197-209.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K. & DAS, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22 (3): 148-155.

BRACKEN, H. D.; TOON, A.; FELDER D. L.; MARTIN J. W.; FINLEY, M.; RASMUSSEN, J.; PALERO, F. & CRANDALL, K. A. (2009a). The Decapod Tree of Life: Compiling the data and moving toward a consensus of decapod evolution the decapod tree of life: compiling the data and moving toward a consensus of decapod evolution. **Arthropod Systematics & Phylogeny**, 67 (1): 99-116.

BRACKEN, H. D.; DE GRAVE, S. & FELDER, D. L. (2009b). Phylogeny of the Infraorder Caridea based on mitochondrial and nuclear genes (Crustacea: Decapoda). *In*: Martin, J. W.; Crandall, K. A. & Felder, D. L. (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues**, 18: 281-305.

BRACKEN-GRISSOM, H. D.; FELDER, D. L.; VOLLMER, N. L.; MARTIN, J. W. & CRANDALL, K. A. (2012). Phylogenetics links monster larva to deep-sea shrimp. **Ecology and Evolution**, 2 (10): 2367-2373.

BROWN, W. M.; GEORGE, M. JR. & WILSON, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76 (4): 1967-1971.

BUCKLIN, A. & ALLENA, L. D. (2004). MtDNA sequencing from zooplankton after long term preservation in buffered formalin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 30: 879-882.

BUHAY, J. E. (2009). ‘‘COI-like’’ sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. **Journal of Crustacean Biology**, 29 (1): 96-110.

CARVALHO, F. L. ; PILEGGI, L. G. & MANTELATTO, F. L. (2013). Molecular data raise the possibility of cryptic species in the Brazilian endemic prawn *Macrobrachium potiuna* (Decapoda, Palaemonidae). **Latin Americam Journal Aquatic Research**, 41 (4): 707-717.

CHACE, F. A., JR. (1972). The shrimps of the Smithsonian-Bredin Caribbean Expeditions with a summary of the West Indian shallow-water species (Crustacea: Decapoda: Natantia). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 98: 1-179.

CHACE, F. A., JR. (1992). On the classification of the Caridea (Decapoda). **Crustaceana**, 63 (1): 70-80.

CHACE, F. A. & HOBBS, H. H. JR. (1969). The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica. **United States National Museum Bulletin**, 292: 1-258.

COOK, B. D.; BAKER, A. M.; PAGE, T. J.; GRANT, S. C.; FAWCETT, J. H.; HURWOOD, D. A. & HUGHES, J. M. (2006). Biogeographic history of an Australian freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Atyidae): the role life history transition in phylogeographic diversification. **Molecular Ecology**, 15: 1083-1093.

COOK, B. D., PRINGLE, C. M. & HUGHES, J. M. (2008a). Molecular evidence for sequential colonization and taxon cycling in freshwater shrimp on a Caribbean island. **Molecular Ecology**, 17: 1066-1075.

COOK, B. D.; PRINGLE, C. M. & HUGHES J. M. (2008b). Phylogeography of an island endemic, the puerto rican freshwater crab (*Epilobocera sinuatifrons*). **Journal of Heredity**, 99 (2): 157-164.

COOK, B. D., BERNAYS, S., PRINGLE, C. M. & HUGHES, J. M. (2009). Marine dispersal determines the genetic population structure of stream fauna of Puerto Rico: evidence for island scale population recovery processes. **Journal of the North American Benthological Society**, 28: 709-718.

COOK, B. D., PRINGLE, C. M. & HUGHES, J. M. (2010). Immigration history of amphidromous species on a Greater Antillean island. **Journal of Biogeography**, 37: 270-277.

COOK, B. D.; PAGE, T. J. & HUGHES, J. M. (2012). Phylogeography of related diadromous species in continental and island settings, and a comparison of their potential and realized dispersal patterns. **Journal of Biogeography**, 39: 421-430.

COSTA, F. O.; DEWAARD, J. R.; BOUTILLIER, J.; RATNASINGHAM, S.; DOOH, R. T.; HAJIBABAEI, M. & HEBERT, D. N. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 64 (2): 272-295.

COWEN, R. K., PARIS , C. B. & SRINIVASAN, A. (2006). Scaling of connectivity in marine populations. **Science**, 311: 522-527.

CRANDALL, E. D.; TAFFEL, J. R. & BARBER, P. H. (2010). High gene flow due to pelagic larval dispersal among South Pacific archipelagos in two amphidromous gastropods (Neritomorpha: Neritidae). **Heredity**, 104: 563-572.

CRUZ-SOLTERO, S. & ALSTON, D. E. (1992). Status report on research with *Atya lanipes* and *A. scabra* in Puerto Rico. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 42: 387-396.

DARNELL, R. M. (1956). Analysis of a population of the tropical freshwater shrimp, *Atya scabra* (Leach). **American Midland Naturalist**, 55 (1): 131-138.

DE GRAVE, S.; CAI, Y. & ANKER, A. (2008). Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595: 287-293.

DE GRAVE, S. & FRANSEN, C. H. J. M. (2011). Carideorum Catalogus: The recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, 85: 195-588.

DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N. D.; AHYONG, S. T.; CHAN, T. Y.; CRANDALL, K. A.; DWORSCHAK, P. C.; FELDER, D. L.; FELDMANN, R. M.; FRANSEN, C. H. J. M.; GOULDING, L. Y. D.; LEMAITRE, R.; LOW, M. E. Y.; MARTIN, J. W.; NG, P. K. L.; SCHWEITZER, C. E.; TAN, S. H.; TSHUDY, D. & WETZER, R. A. (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, 21: 1-109.

DENNENMOSER, S.; THIEL, M. & SCHUBART, C. D. (2010). High genetic variability with no apparent geographic structuring in the mtDNA of the amphidromous river shrimp *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) in Northern-Central Chile. **Journal of Crustacean Biology**, 30 (4):762-766.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479-491.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. & SCHENEIDER, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1: 47-50.

FELGENHAUER, B. E. & ABELE, L. G. (1983). Phylogenetic relationships among shrimp-like decapods. *In*: F. Schram (Ed.). Crustacean Phylogeny**,** A. A. Balkema, Rotterdam, **Crustacean issues,** 1: 291-311.

FRYER, G. (1977). Studies on the functional morphology and ecology of the atyid prawns of Dominica. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B), Biological Sciences**, 277 (952): 57-128.

GALVÃO, R. & BUENO, S. L. S. (2000). Population structure and reproductive biology of the Camacuto shrimp, *Atya scabra* (Decapoda, Caridea, Atyidae), from São Sebastião, Brazil. *In*: Schram, F. R. & Von Vaupel Klein, J. C. (Eds.). Crustaceans and the Biodiversity Crisis - Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress, Amsterdam, The Netherlands, July 20-24, 1998. J. Brill, Leiden. **Crustacean Issues**, 12 (2): 291-299.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; MONTEIRO, F. A. & SOLÉ-CAVA, A. M. (2006). Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus riveti*. **Marine Biology**, 149: 491-502.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. C.; HEBERT, P. D. N. & HICKEY, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, 23 (4): 167-172.

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.

HENDRY, A. P. & KINNISON, M. T. (2001). An introduction to microevolution: rate, pattern, process. **Genetica**, 112: 1-8.

HERRERA-CORREA, J.; MOSSOLIN, E. C.; WEHRTMANN, I. S. & MANTELATTO, F. L. (2013). Reproductive aspects of the caridean shrimp *Atya scabra* (Leach, 1815) (Decapoda: Atyidae) in São Sebastião Island, southern Atlantic, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 41 (4): 676-684.

HILLIS, D. M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. **Annual Review Ecology and Systematics**, 18: 23-42.

HOAREAU, T. B.; LECOMTE-FINIGER, R.; GRONDIN, H. P.; CONAND, C. & BERREBI, P. (2007). Oceanic larval life of La Rèunio 'bichiques', amphidromous gobiid post-larvae. **Marine Ecology Progress Series**, 333: 303-308.

HOBBS, H. H., JR. & HART, C. W., JR. (1982). The shrimp genus *Atya* (Decapoda: Atyidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 364: 1-143.

HOHENLOHE, P. A. (2004). Limits to gene flow in marine animals with planktonic larvae: models of *Littorina* species around Point Conception, California. **Biological Journal of the Linnean Society**, 82: 169-187.

HOŁYŃSKI, R. B. (2010). Taxonomy and the mediocrity of DNA Barcoding - some remarks on PACKER *et al.* 2009: DNA Barcoding and the mediocrity of morphology. **Arthropod Systematics & Phylogeny**, 68 (1): 143-150.

HOLTHUIS, L. B. (1955). The recent genera of the caridean and stenopodidean shrimps (class Crustacea, order Decapoda, supersection Natantia) with keys for their determination. **Zoologische Verhandelingen**, 26: 1-157.

HOLTHUIS, L. B. (1966). The freshwater shrimps of the Island of Annobon, West Africa. **Studies in Tropical Oceanography**, 4 (1): 224-239.

HOLTHUIS, L. B. (1980). FAO species catalogue. Vol. 1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fisheries Synopsis**, 125 (1): 271 p.

LEACH, W. E. (1815). A tabular view of the external characters of four classes of animals, which linne arranged under Insecta, with the distribution of the genera composing three of these classes into orders, &c. and descriptions of several new genera and species. **Transactions of the Linnean Society of London**, 11: 306-400.

LEACH, W. E. (1816). *Atya*. *In*: **Encyclopedia Brittanica**, supplement to the fourth, fifth and sixth editions. Archibald Constable and Company, Edinburgh, 421 p.

LORÁN-NÚÑEZ, R. M.; VALDEZ-GUZMÁN, A. J. & MARTÍNEZ-ISUNZA, F. R. (2009). Estudio biologivo-pesquero del "burro" *Atya scabra* em el río Los Pescados y río Actopan, Veracruz, México. **Ciencia Pesquera**, 17 (1): 5-16.

LORD, C.; LORION, J.; DETTAI, A.; WATANABE, S.; TSUKAMOTO, K.; CRUAUD, C. & KEITH, P. (2012). From endemism to widespread distribution: phylogeography of three amphidromous *Sicyopterus* species (Teleostei: Gobioidei: Sicydiinae). **Marine Ecology Progress Series**, 455: 269-285.

KAWANE, M.; WADA, K.; UMEMOTO, A. & MIURA T. (2012). Genetic population structure and life history characteristics of the rare brackish-water crab *Deiratonotus kaoriae* Miura, Kawane and Wada, 2007 (Brachyura: Camptandriidae) in Western Japan. **Journal of Crustacean Biology**, 32 (1): 119-125.

KIMURA, N. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120.

KNOWLTON, N. (1986). Cryptic and sibling species among the Decapod Crustacea. **Journal of Crustacean Biology**, 6 (3): 356-363.

MANTELATTO, F. L. M.; ROBLES, R.; BIAGI, R. & FELDER, D. L. (2006). Molecular analysis of the taxonomic and distributional status for the hermit crab genera *Loxopagurus* Forest, 1964 and *Isocheles* Stimpson, 1858 (Decapoda, Anomura, Diogenidae). **Zoosystema**, 28 (2): 495-506.

MANTELATTO, F. L.; ROBLES, R. & FELDER, D. L. (2007). Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 150 (1): 211-220.

MANTELATO, F. L.; ROBLES, R.; SCHUBART, C. D. & FELDER, D. L. (2009). Molecular phylogeny of the genus *Cronius* Stimpson, I860, with reassignment of *C. tumidulus* and several american species of *Portunus* to the genus *Achelous* De Haan, 1833 (Brachyura: Portunidae). *In*: Martin, J. W.; Crandall, K. A. & Felder, D. L. (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues,** 18: 567-579.

MARCGRAVE, G. (1648). Historiae rerum naturalium Brasiliae, libri octo: Quorum tres priores agunt de plantis, quartus de piscibus, quintus de avibus, sextus de quadrupedibus, et serpentibus, septimus de insectis, octavus de ipsa regione, et illius incolis, cum appendice de Tapuyis, et Chilensibus. *In*: Piso, G. & Marcgraf, G. L. (Eds.). **Historia naturalis Brasiliae**, 293 p.

MARTIN, J. W. & DAVIS, G. E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. **Natural History Museum of Los Angeles County**, **Science Series**, 39: 1-124.

MCDOWALL, R. M. (2007). On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. **Fish and Fisheries**, 8: 1-13.

MCLAUGHLIN, P. A. (1980). **Comparative morphology of recent Crustacea**. W. H. Freeman and Company, São Francisco, 177 p.

MCLAY, C. L.; HINNENDAEL, F.; LAVERY, S. & RIQUELME-BUGUEÑO, R. B. (2011). Morphological and molecular comparison of *Hemigrapsus crenulatus* (Milne Edwards, 1837) (Brachyura: Varunidae) from New Zealand and Chile: Was Miss Rathbun right?. **Journal of Crustacean Biology**, 31 (4): 582-589.

MELO, G. A. S. (2003). **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. Edições Loyola, São Paulo, 430 p.

MERINO, M. (1997). Upwelling on the Yucatan Shelf: hydrographic evidence. **Journal of Marine Systems**, 13: 101-121.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E. & BROWN, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 269-292.

NEGRI, M., PILEGGI, L. G. & MANTELATTO, F. L. (2012). Molecular barcode and morphological analyses reveal the taxonomic and biogeographical status of the stripedlegged hermit crab species *Clibanarius sclopetarius* (Herbst, 1796) and *Clibanarius vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Diogenidae). **Invertebrate Systematics**, 26 (5/6): 561-571.

OCAMPO, E. H.; ROBLES, R.; TEROSSI, M.; NUÑEZ, J. D.; CLEDÓN, M. & MANTELATTO, F. L. (2013). Phylogeny, phylogeography, and systematics of the American pea crab genus *Calyptraeotheres* Campos, 1990, inferred from molecular markers. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 169: 27-42.

OEY, L-Y.; EZER, T. & LEE, H. C. (2005). Loop Current, rings and related circulation in the Gulf of Mexico: A review of numerical models and future challenges. *In*: Sturges, W. & Lugo-Fernandez, A. (Eds.). Circulation in the Gulf of Mexico: Observations and Models. Washington, DC, American Geophysical Union. **Geophysical Monograph Series**, 161: 31-56.

OLIVEIRA, L. P. H. (1945). Verificação da existência de *Atya scabra* Leach, camarão dágua doce da família Atyidae, Crustacea, no nordeste do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 43 (2): 177-190.

PAGE, T. J.; BAKER, A. M.; COOK, B. D. & HUGHES, J. M. (2005). Historical transoceanic dispersal of a freshwater shrimp: the colonization of the South Pacific by the genus *Paratya* (Atyidae). **Journal of Biogeography**, 32: 581-593.

PAGE, T. J.; VON RINTELEN, K. & HUGHES, J. M. (2007). An island in the stream: Australia's place in the cosmopolitan world of Indo-West Pacific freshwater shrimp (Decapoda: Atyidae: Caridina). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 43: 645-659.

PAGE, T. J.; COOK, B. D.; VON RINTELEN, T.; VON RINTELEN, K. & HUGHES, J. M. (2008). Evolutionary relationships of atyid shrimps imply both ancient Caribbean radiations and common marine dispersals. **Journal of the North American Benthological Society**, 27 (1): 68-83.

PAGE, T. J. & HUGHES, J. M. (2011). Neither molecular nor morphological data have all the answers; with an example from *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from Australia. **Zootaxa**, 2874: 65-68.

PAGE, T. J.; TORATI, L. S.; COOK, B. D.; BINDERUP, A.; PRINGLE, C. M.; REUSCHEL; S., SCHUBART, C. D. & HUGHES, J. M. (2013). Invertébrés sans frontières: Large scales of connectivity of selected freshwater species among Caribbean Islands. **Biotropica**, 45 (2): 236-244.

PALUMBI S. R.; MARTIN A., ROMANO S.; MCMILLAN W. O.; STICE L. & GRABOWSKI, G. (1991). **The simple fool's guide to PCR**. Honolulu: University of Hawaii Press, ver. 2, 45 p.

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

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 (2): 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.

PUILLANDRE, N.; MACPHERSON, E.; LAMBOURDIÈREC, J.; CRAUDO, C.; BOISSELIER-DUBAYLE, M. C. & SAMADI, S. (2011). Barcoding type specimens helps to identify synonyms and an unnamed new species in *Eumunida* Smith, 1883 (Decapoda: Eumunididae). **Invertebrate Systematics**, 25: 322-333.

ROBE, L. J.; MACHADO, S. & BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. (2012). The DNA barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). **Zoological Science**, 29 (10): 714-724.

ROBERTS, C. M. (1997). Connectivity and management of Caribbean coral reefs. **Science**, 278: 1454-1456.

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. doi:10.1371/journal.pone.0054698.

ROZAS, J. & ROZAS, R. (1999). DnaSP version 3.0: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, 15: 174-175.

SANTOS, S. SCHNEIDER, H. & SAMPAIO, I. (2003). Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, 26 (2): 151-161.

SANTOS, S.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; SCHNEIDER, H. & SAMPAIO I. (2006). Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**, 15: 4361-4373.

SCHANDER, C. & HALANYCH, K. M. (2003). DNA, PCR and formalinized animal tissue - a short review and protocols. **Organism Diversity & Evolution**, 3: 195-205.

SCHMITZ, W. J. JR.; BIGGS, D. C., LUGO-FERNANDEZ, A., OEY, L.-Y. & STURGES, W. (2005). A synopsis of the circulation in the Gulf of Mexico and on its continental margins. *In*: STURGES, W. & LUGO-FERNANDEZ, A. (Eds.). Circulation in the Gulf of Mexico: Observations and Models. Washington, DC, American Geophysical Union. **Geophysical Monograph Series**, 161: 11-30.

SCHLÖTTERER, C. (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion?. **Nature Reviews Genetics**, 5 (1): 63-69.

SITES, J. W., JR. & MARSHALL, J. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 18 (9): 462-470

SLATKIN, M. (1985a). Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 16: 393-430.

SLATKIN, M. (1985b). Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, 39 (1): 53-65.

SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, 236: 787-792.

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 (2): 817-830.

SCHUBART, C. D. & HUBER M. G. J. (2006). Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, 380-381: 1019-1028.

STAMATAKIS, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, 22 (21): 2688-2690.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P. & ROUGEMONT, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers**. Systematic Biology**, 57 (5): 758-771.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N; STECHER, G; NEI, M. & KUMAR, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28: 2731-2739.

TEROSSI, M. & MANTELATTO, F. L. (2012). Morphological and genetic variability in *Hippolyte obliquimanus* Dana, 1852 (Decapoda: Caridea: Hippolytidae) from Brazil and the Caribbean Sea. **Crustaceana**, 85 (6): 685-712.

TOURINHO, J. L.; SOLÉ-CAVA, A. M. & LAZOSKI C. (2012). Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*. **Marine Biology**, 159: 1897-1906.

TSUKAGOSHI, H.; YOKOYAMA, R. & GOTO, A. (2011). Mitochondrial DNA analysis reveals a unique population structure of theamphidromous sculpin *Cottus pollux* middle-egg type (Teleostei: Cottidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 60: 265-270.

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.

VILLALOBOS, A. F. (1943). **Estudio morfologico de la *Atya scabra* (Crust. Decap.)**. Faculdad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. (Dissertação de Mestrado), 70 p.

VILLALOBOS, J. L. & ÁLVAREZ, F. (1997). Atyidae (burritos, camaroncitos). *In*: Soriano, E. G.; Oirzo, R. & Vogt, R. C. (Eds.). **Historia Natural de Los Tuxtlas**. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Ciudad de México, 401-403.

VON RINTELEN, K.; PAGE, T. J.; CAI, Y.; ROE, K.; STELBRINK, B.; KUHAJDA, B. R.; ILIFFE, T. M.; HUGHES, J. & VON RINTELEN, T. (2012). Drawn to the dark side: A molecular phylogeny of freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea: Atyidae) reveals frequent cave invasions and challenges current taxonomic hypotheses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 63: 82-96.

WEESE, D. A.; FUJITA Y.; HIDAKA, M. & SANTOS S. R. (2012). The long and short of it: genetic variation and population structure of the anchialine atyid shrimp *Caridina rubella* on Miyako-Jima, Japan. **Journal of Crustacean Biology**, 32 (1): 109-117.

ZUCCON, D.; BRISSET, J.; CORBARI, L.; PUILLANDRE, J. U. & SAMADI, S. (2012). An optimized protocol for barcoding museum collections of decapod crustaceans: a case-study for a 10-40-years-old collection. **Invertebrate Systematics**, 26 (5/6): 592-600.