UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Avaliação sistemática de camarões de água doce do gênero *Atya* Leach, 1816
(Crustacea: Decapoda: Atyidae) por meio de dados moleculares

Caio Martins Cruz Alves de Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA

Ribeirão Preto - SP

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Avaliação sistemática de camarões de água doce do gênero *Atya* Leach, 1816
(Crustacea: Decapoda: Atyidae) por meio de dados moleculares

Caio Martins Cruz Alves de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Terossi Rodrigues Mariano

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA

Versão Original

Ribeirão Preto - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Oliveira, C. M. C. A.

“Avaliação sistemática de camarões de água doce do gênero *Atya* Leach, 1816 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) por meio de dados moleculares”

Ribeirão Preto, 2017

vii+107p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia Comparada). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP).

Orientador: Mantelatto, F.L.M.; Co-orientadora: Mariano, M.T.R.

1. Delimitação de espécies 2. *Atya gabonensis* 3. *Atya innocous* 4. *Atya margaritacea* 5. *Atya scabra* 6. Subunidade Ribossomal 16S 7. Citocromo Oxidase I (COI) 8. Histona 3 (H3).

OLIVEIRA, C. M. C. A. - **Avaliação sistemática de camarões de água doce do gênero *Atya* Leach, 1816 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) por meio de dados moleculares**. 107p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, por toda dedicação e amor

AGRADECIMENTOS

O projeto desenvolvido durante meu mestrado é o resultado da colaboração de muitas pessoas, instituições e agências, de forma que a subtração de qualquer um dos elementos citados a seguir inviabilizaria a produção da presente dissertação conforme apresentada. Dessa forma, é com um grande sentimento de gratidão que faço meus agradecimentos.

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Fernando Luis Medina Mantelatto, pelo acolhimento em seu Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC). Oportunidade que me ofereceu a infraestrutura e o financiamento necessários para a realização deste projeto. Ainda, agradeço sinceramente pelo esforço dedicado à minha pessoa e ao meu projeto nesse período, ao grande número de oportunidades que me foram concedidas, todas imprescindíveis para meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço também a confiança demonstrada ao longo de todo o desenvolvimento e execução do projeto.

Sou profundamente grato à minha orientadora Dr. Mariana Terossi Rodrigues Mariano, uma pessoa que de maneira dedicada e afetuosa contribuiu me auxiliando em todos os momentos que precisei. Sua contribuição para minha formação pessoal e profissional, bem como para elaboração desse trabalho foi imensa. Agradeço muito por ter sua confiança e amizade. E muito obrigado pelas horas de dedicação!

Agradeço à Universidade de São Paulo (USP), à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) e ao Departamento de Biologia por toda infraestrutura disponibilizada nesse período. Sou grato ainda a todos os professores e funcionários da FFCLRP-USP, todos muito importantes na minha formação.

Deixo minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela bolsa de mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Também agradeço aos competentes coordenadores Prof. Dr. Ricardo Castro, Profa. Dra. Tiana

Kohlsdorf e Prof. Dr. Milton Groppo, e à atenciosa secretária Vera Cicilini, por terem sempre me instruído e incentivado.

Sou grato às agências de fomento à pesquisa, que por intermédio dos projetos que fomentam o LBSC, concedidos ao Prof. Dr. Fernando L. M. Mantelatto, FAPESP Programa Biota Temático 2010/50188-8; CNPq 471011/2011-8 e 302748/2015-5, Coleções Científicas 504322/2012-5, CAPES (Ciências do Mar II Proc. 2005/2014 - 23038.004308/201414) e CNPq Universal Processo 444459/2014-6, concedido a Profa. Dra. Mariana T. R. Mariano, que custearam os gastos deste projeto de mestrado.

Agradeço aos curadores, técnicos e responsáveis pelas coleções biológicas que permitiram o acesso e uso de seus lotes ou viabilizaram os empréstimos, todos imprescindíveis à realização deste trabalho: Charles Fransen e Karen von Dorp (RMNH, Holanda), Cristiana Serejo (MNRJ - Rio de Janeiro), Fernando Alvarez e Jose Luis Villalobos (CNCR, Mexico), Fernando Mantelatto (CCDB, Ribeirão Preto), Ingo Wehrtmann e Rita Vargas (MZ-UCR, Costa Rica), Jesser Fidélis (MOUFPE, Recife), Marcos Tavares e Joana Darc (MZ-USP, São Paulo), Miranda Lowe e Andrew Cabrinovic (NHM, Londres), Paula Araújo (DZ-UFRGS, Porto Alegre) e Glaucia Maria F. Pontes (DZ-PUC-RS, Porto Alegre).

Muito obrigado aos colegas que transportaram espécimes emprestados de coleções carcinológicas, Edvanda Carvalho, Tatiana Magalhães, Natália Rossi, Célio Magalhães e Rafael Robles.

Muito obrigado à equipe do Projeto Piabanha e à Dr. Samara Barros (UFS) pela coleta e doação de espécimes.

Agradeço a todos os membros do LBSC pelo convívio, acolhimento e ajuda nas mais diversas situações. Agradeço ainda todas as conversas, dicas e discussões sobre diversos assuntos relacionados ao meio acadêmico e também em particular às linhas de pesquisa do LBSC.

Agradeço também aos técnicos Álvaro da Silva Costa e Mayara Miyazaki pela manutenção dos equipamentos e reagentes do laboratório, bem como pelo apoio em diversos momentos.

Sou muito agradecido aos membros da minha banca de qualificação, os quais fizeram sugestões durante a execução deste projeto Prof. Dr. Dalton Amorin, Prof. Dr. Milton Groppo e Dr. Rafael Robles, bem como a Profa. Dra. Irene Cardoso (MNRJ) por aceitar ser parecerista do meu relatório parcial.

Muito obrigado ao meu amigo Patrick W. dos Santos pelas dicas e ajuda na preparação das imagens.

Agradeço todos meus amigos e pessoas que fazem ou fizeram parte da minha vida durante esse período, todas imprescindíveis para minha felicidade e bem estar pessoal.

A toda minha família e em especial aos meus pais, José e Rosane, e minha irmã Júlia, pelo amparo, companheirismo e amor incondicional.

“It all comes, I believe, from trying to define the undefinable”

Charles Darwin - 1856

(Burkhardt & Smith 1990, p. 309)

RESUMO

Oliveira, Caio Martins Cruz Alves de. **Avaliação sistemática de camarões de água doce do gênero *Atya* Leach, 1816 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) por meio de dados moleculares.** 107p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Os camarões do gênero *Atya* Leach, 1816 são os maiores camarões da família Atyidae, sendo que as 13 espécies reconhecidas estão distribuídas em rios e riachos das regiões tropicais e subtropicais da América (vertentes atlântica e pacífica) e oeste da África. O primeiro relato de uma *Atya* ocorreu no séc. XVII e, desde então, novas espécies foram descritas e descrições prévias revisadas, produzindo um histórico de instabilidade e reclassificações. Embora ao longo do séc. XX revisões taxonômicas tenham estabilizado a sistemática do gênero, a variabilidade morfológica e distribuição geográfica trans-istmica da espécie *A. innocous* gerou questionamentos. Além disso, mais recentemente trabalhos de filogenia molecular da família Atyidae que incluíram representantes de *Atya* suscitaram questões em relação à sistemática do gênero (possível não monofilia) e de algumas espécies como *A. gabonensis*, *A. margaritacea* e *A. scabra*. Visto que o uso de marcadores moleculares nunca foi empregado para a delimitação das espécies de *Atya* e que seu uso de forma complementar à morfologia poderia aperfeiçoar a sistemática do gênero, o objetivo do presente estudo foi avaliar por meio de dados moleculares as hipóteses taxonômicas das espécies *A. gabonensis*, *A. innocous*, *A. margaritacea* e *A. scabra*. Sequências dos genes mitocondriais 16S e Citocromo Oxidase I e gene nuclear Histona 3 foram geradas por meio de protocolos de extração e sequenciamento de DNA a partir do tecido de espécimes obtidos em empréstimos/doações. Potenciais espécies evidenciadas pelas análises de similaridade nucleotídicas (distâncias genéticas), compartilhamento de caracteres em um contexto evolutivo (reconstruções filogenéticas), Automatic Barcode Gap Discovery, Poisson Tree Processes e Generalized Mixed Yule Coalescence foram confrontadas com as hipóteses taxonômicas específicas atuais. A avaliação sistemática com dados moleculares aqui realizada, adicionalmente às informações morfológicas existentes na literatura sustentaram *A. gabonensis* como uma espécie de distribuição anfi-atlântica, mas não corroborou a hipótese de *A. innocous* como uma espécie trans-istmica. Assim, o uso do nome *A. innocous* para as populações do Mar do Caribe e *A. tenella* para aquelas restritas ao Pacífico é sugerido. A espécie *A. margaritacea*, distribuída ao longo da costa pacífica da América foi considerada uma espécie válida e distinta de *A. scabra*, amplamente distribuída na vertente atlântica da América do Sul, África e Mar do Caribe. Contudo, é discutida a possibilidade de uma espécie críptica restrita no Golfo do México existir. Adicionalmente, o conhecimento existente e pertinente para futuros estudos de sistemática e taxonomia sobre os camarões do gênero *Atya* foram sumarizados e são apresentados.

Palavras-chave: Delimitação de espécies. *Atya gabonensis*. *Atya innocous*. *Atya margaritacea*. *Atya scabra*. Subunidade Ribossomal 16S. Citocromo Oxidase I (COI). Histona 3 (H3).

ABSTRACT

Oliveira, Caio Martins Cruz Alves de. **Systematic evaluation of freshwater prawns of the genus *Atya* Leach, 1816 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) by means of molecular data**. 107p. Dissertation (Masters in Comparative Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The genus *Atya* Leach, 1816 shrimps are the largest of the Atyidae family, and the 13 acknowledge species are geographically distributed in rivers and stream in the tropical and subtropical regions of America (Atlantic and Pacific drainages) and West Africa. The first registry of an *Atya* was in the XVII century and since then new species were described and previous description revised in an eventful taxonomic historic. Although throughout the XX century taxonomic revisions stabilized the genus systematics, the morphological variability and the trans-isthmian geographic distribution of *A. innocous* caused questioning. Moreover, molecular phylogenetic studies that included *Atya* representatives raised doubt on the genus systematics (possibly non-monophyletism) and some species *A. gabonensis*, *A. margaritacea* and *A. scabra* hypothesis. As molecular markers have never been used concerning *Atya* species delimitation complementary to the morphology and it could improve the genus systematics, the goal of this study was to evaluate with molecular markers the taxonomic hypothesis of the species *A. gabonensis*, *A. innocous*, *A. margaritacea* e *A. scabra*. Sequences of the mitochondrial genes 16S and Cytochrome Oxidase I and nuclear gene Histone 3 were generated by means of DNA extraction and sequence protocols from specimens obtained in loans/donations. Putative species evidenced by the analysis of nucleotide similarity (genetic distances), character sharing (phylogenetic reconstitutions), Automatic Barcode Gap Discovery, Poisson Tree Processes and Generalized Mixed Yule Coalescence were compared to the prevailing taxonomic hypothesis. The systematic evaluation with the molecular data of this study, in addition with the morphological information in the literature sustain *A. gabonensis* as an amphi-atlantic distributed species, but do not corroborated *A. innocous* hypothesis as an trans-isthmian species. In this sense, the use of *A. innocous* “stricto sensu” for the Caribbean’s Sea populations and *A. tenella* to that restricted to the pacific drainage of America is suggested. *Atya margaritacea*, distributed along the pacific drainage of America, is considered a valid species distinct from *A. scabra*, widespread distributed in the Atlantic drainage of America and Africa, besides Caribbean Sea. However, the possibility of a cryptic species in the Gulf of Mexico population is discussed. Additionally, the relevant knowledge to future systematic and taxonomy studies about the shrimps of the genus *Atya* were summarized and are shown.

Keywords: Species delimitation. *Atya gabonensis*. *Atya innocous*. *Atya margaritacea*. *Atya scabra*. Ribosomal subunit 16S. Cytochrome Oxidase I (COI). Histone 3 (H3).

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os camarões do gênero <i>Atya</i> , Leach 1816	1
1.1.1. Classificação	1
1.1.2. Identificação e caracterização morfológica	2
1.1.3. Biologia, ecologia e importância econômica	3
1.1.4. Histórico taxonômico	5
1.1.5. Filogenia	9
1.2. Questões sistemáticas	10
1.2.1. <i>A. gabonensis</i> (América/África)	10
1.2.2. <i>A. innocous</i> (Atlântico/Pacífico)	11
1.2.3. <i>A. scabra</i> / <i>A. margaritacea</i>	13
1.3. Delimitação molecular de espécies	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL & MÉTODOS	21
3.1. Obtenção dos dados moleculares	21
3.1.1. Aquisição e identificação de exemplares	21
3.1.2. Isolamento do DNA	26
3.1.3. Escolha e amplificação dos marcadores	27
3.1.4. Purificação e sequenciamento do DNA	29
3.1.5. Edição e alinhamento das sequências	30
3.2. Análises	32
3.2.1 Construção de árvores filogenéticas	32
3.2.2. Matrizes de distância genética	34
3.2.3. Delimitação molecular de espécies	35

4. RESULTADOS	37
4.1. Obtenção de dados moleculares	37
4.2. Análises filogenéticas	40
4.3. Análises de distância genética	50
4.4. ABGD, PTP e GMYC	55
5. DISCUSSÃO	61
5.1. Delimitação molecular de espécies	61
5.2. <i>Sistemática do gênero Atya</i>	64
5.2.1. A questão <i>A. gabonensis</i> (América/África)	64
5.2.2. A questão <i>A. innocous</i> (Atlântico/Pacífico)	65
5.2.3. A questão <i>A. scabra/A. margaritacea</i>	67
5.2.4. Posicionamento de <i>A. ortmannioides</i>	71
5.2.5. Sumário de informações e questões identificadas	73
6. CONCLUSÃO	79
7. REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os camarões do gênero *Atya* Leach, 1816

1.1.1. Classificação

Os crustáceos são artrópodes cujos representantes estão entre os invertebrados mais diversos e populares do mundo (McLaughlin, 1980; Martin & Davis, 2001). Com perto de 17 mil espécies descritas, os crustáceos da ordem Decapoda Latreille, 1802 (entre eles, camarões, lagostas, siris, caranguejos e ermitões) são os mais comumente reconhecidos e estudados, presumivelmente em virtude de sua distribuição mundial, ampla diversidade ecológica e taxonômica, amplo registro fóssil (desde o Devoniano), bem como interesse na exploração econômica/comercial (Holthuis, 1980; Martin & Davis, 2001; De Grave *et al.*, 2009; Schram, 2009).

A maior parte das espécies de camarões pertence à infraordem Caridea Latreille, 1817, a qual soma ao menos 3.500 espécies encontradas em ambientes marinhos e dulcícolas no mundo todo (Bauer, 2004; De Grave *et al.*, 2008; Fransen & De Grave, 2009; De Grave & Fransen, 2011). Dentre os camarões adaptados aos ambientes de água doce, os representantes da família Atyidae De Haan, 1849 são aqueles reconhecidos pelo seu hábito filtrador único entre os decápodes, habitando rios, córregos e lagos (Ortmann, 1894; Bouvier, 1925; Chace & Hobbs, 1969; Fryer, 1977).

Mais de 460 espécies de atyídeos são atualmente reconhecidas e classificadas em 43 gêneros, embora tal diversidade seja provavelmente subestimada e sujeita a constantes atualizações (De Grave *et al.*, 2008; De Grave & Fransen, 2011; Christodoulou *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2012; von Rintelen *et al.*, 2012; Castelin *et al.*, 2013; De Grave & Page, 2014). Dessa forma, o agrupamento desses gêneros em táxons dentro da família Atyidae não é bem estabelecido, sendo que a classificação tradicional em subfamílias (Atyinae, Caridellinae, Paratyinae e Typhlatyinae) adotadas e/ou discutidas por alguns autores (Bouvier, 1925; Holthuis, 1993; Page *et al.*, 2008) não tem sido reconhecida (De Grave *et al.*, 2009) ou resistido à avaliação filogenética de outros (von Rintelen *et al.*, 2012). Estes últimos identificam cinco linhagens supra

genéricas informalmente nomeadas de “grupo *Atya*”, “grupo *Caridella*”, “grupo *Paratya*”, “grupo *Typhlatya*” e “Syncaridinae”.

Nesse sentido, embora a maioria dos representantes da família sejam registrados nas regiões biogeográficas Australiana e Oriental, a linhagem “grupo *Atya*” sensu von Rintelen *et al.* (2012) são os atyídeos predominantes das regiões Neotropical e Afrotropical. Dentre os sete gêneros agrupados nessa linhagem (*Atya*; *Atyoida* Randall, 1840; *Atyopsis* Chace, 1983; *Australatya* Chace, 1983; *Micratya* Bouvier, 1913; *Jonga* Hart, 1961 e *Potimirim* Holthuis, 1954), *Atya* apresenta a distribuição geográfica mais ampla e o maior número de espécies descritas (De Grave *et al.*, 2008; Page *et al.*, 2008).

As 13 espécies reconhecidas do gênero estão distribuídas nas duas vertentes da América, pacífica (do norte do México até o Peru) e atlântica (do norte do México ao sul do Brasil, incluindo diversas ilhas no mar do Caribe), e na costa atlântica da África (do Senegal à África do Sul, incluindo ilhas de Cabo Verde e da Guiné Equatorial) (Hobbs & Hart, 1982; Holthuis, 1986; Felgenhauer & Martin, 1983; De Grave & Fransen, 2011; presente estudo).

1.1.2. Identificação e caracterização morfológica

Os camarões carídeos apresentam a pleura do segundo segmento abdominal expandida, recobrando lateralmente o primeiro e o segundo somitos abdominais, o terceiro par de pereópodes não quelados e filobrânquias sob a carapaça (Figura 1A) (Chace, 1972; McLaughlin, 1980; Holthuis, 1993; Bauer, 2004). Já os representantes da família Atyidae possuem os dois primeiros pares de pereópodes com tamanhos iguais, e com as quelas (dátilo + própodo) portando cerdas (em forma de “pincéis”) (Figura 1A) (Chace & Hobbs, 1969; Fryer, 1977; Chace, 1992; Bauer, 2004).

A diagnose morfológica para a hipótese atual do gênero *Atya* foi feita por Hobbs & Hart (1982), e sua distinção morfológica em relação aos demais atyídeos similares, todos restritos ao Indo-Pacífico e Austrália, foi revisada por Chace (1983). Dentre os caracteres diagnósticos são listados a seguir os mais evidentes que, em conjunto, distinguem um representante do gênero (Figura 1A):

(1) carpo do segundo par de pereópodes escavado anteriormente, mais longo do que largo (em forma de meia lua); (2) Ângulos posterolaterais do télson não ultrapassando a margem posterior deste segmento; (3) Terceiro e quarto par de pereópodes mais desenvolvidos e robustos do que os demais; (4) Rostro geralmente sem espinhos dorsais (com exceção de *A. crassa* e *A. limnetes*); (5) Mero do terceiro par de pereópodes com ornamentações variáveis quanto a presença e grau de desenvolvimento de tubérculos esclerotizados e/ou espinhos, mas nunca apresentando um esporão maciço (Chace, 1972, 1983; Hobbs & Hart, 1982; Holthuis, 1993).

1.1.3. *Biologia, ecologia e importância econômica*

Os camarões do gênero *Atya* (Figura 1B) são animais conspícuos que podem ultrapassar os 12 cm de comprimento (Hobbs & Hart, 1982; Fièvet *et al.*, 2001). Geralmente são encontradas em rios e riachos rasos com fluxo de água rápido/forte e substrato rochoso (Darnell, 1956; Villalobos & Alvarez, 1997; Galvão & Bueno, 2000), apesar de também habitarem ambientes como poças intermitentes, rios profundos, lagoas (Fryer, 1977; Hobbs & Hart, 1982) e águas subterrâneas de cavernas (Peck, 1975; Hobbs III, 1994).

Esses camarões se alimentam por meio da filtragem de partículas em suspensão na água corrente e/ou raspagem de partículas incrustadas no substrato (Chace & Hobbs, 1969; Fryer, 1977), sendo consumidores de algas filamentosas, diatomáceas e detritos de folhas ou artrópodes (Fryer, 1977; Felgenhauer & Abele, 1985; Pringle *et al.*, 1993). Devido ao seu forrageamento que movimenta sedimentos do substrato para a coluna d'água também são considerados bioturbadores de importância ecológica reconhecida em seus ambientes (Crowl *et al.*, 2001; March *et al.*, 2002; March & Pringle, 2003; Coat *et al.*, 2009; Lefrançois *et al.*, 2011).

Por exemplo, influenciando a composição de algas (Pringle *et al.*, 1993), participando da ciclagem de nutrientes e disponibilizando matéria orgânica para níveis tróficos superiores (Pringle *et al.*, 1999), processando serrapilheira e facilitando a atividade de microrganismos decompositores (Wright & Covich,

2005; Rincón & Covich, 2014) e servindo de alimento para outros crustáceos (Crowl & Covich, 1994), peixes (Hein & Crowl, 2010) e seres humanos (Hobbs & Hart, 1982).

Com relação a reprodução, tais camarões são considerados organismos com ciclo de vida anfídromo (ou anfidrômico) (Chace & Hobbs, 1969; McDowall, 2007; Bauer, 2013). Ou seja, os adultos vivem e se reproduzem em ambientes dulcícolas, ao passo que as larvas, uma vez que eclodem dos ovos armazenados nos abdômenes das fêmeas (Bauer, 2004; Palacios *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010), são transportadas pelo fluxo de água do rio até regiões de estuários ou marinhas, onde o desenvolvimento larval, que pode durar mais de 100 dias (10 estágios) ocorre (Hunte, 1979; Abrunhosa & Moura, 1988; Bauer, 2013).

Uma vez juvenis, os indivíduos migram ativamente em direção aos ambientes dulcícolas (Benstead *et al.*, 2000; Bauer, 2011), nos quais os adultos podem viver entre quatro e oito anos em média, com um máximo registrado em laboratório de 12 anos (Abele, 1975; Fryer, 1977; Cross *et al.*, 2008). Dessa forma, o ciclo de vida anfídromo torna esses camarões integrantes de diferentes comunidades em habitats dulcícolas e marinhos também, sendo inclusive agentes importantes na transferência de energia e matéria entre tais ambientes (Coat *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2011).

Do ponto de vista comercial, o grande porte, comportamento dócil e relativa facilidade de captura das espécies de *Atya* despertam algum interesse na produção comercial (aquicultura) (Cruz-Soltero & Alston, 1992; Ovie & Eze, 2013) e no uso como espécies ornamentais para o aquarismo (ou aquariofilia) (De Grave *et al.*, 2008; Turkmen & Karadal, 2012). Contudo, o uso humano ocorre predominantemente na alimentação de populações ribeirinhas, por meio da pesca artesanal de subsistência no Brasil, Venezuela, ilhas no Mar do Caribe, México, Nigéria, São Tomé e Príncipe, Gana, Camarões, etc. (Villalobos, 1943; Oliveira, 1945; Chace & Hobbs, 1969; Holthuis, 1980; Hobbs & Hart, 1982; Cruz-Soltero & Alston, 1992; Martínez-Mayén & Román-Contreras, 2000; Almeida *et al.*, 2010; Ovie & Eze, 2013).

Apesar disso, avaliações realizadas do *status* de conservação das espécies de *Atya* identificaram que as principais ameaças à continuidade de

suas populações são aquelas relacionadas com a descaracterização de seus habitats, como a construção de barragens, extração de água, poluição dos rios e estuários, etc. (De Grave, 2013; De Grave *et al.*, 2013a; Villalobos *et al.*, 2013; De Grave *et al.*, 2015; Mantelatto *et al.*, 2016), que podem interromper a migração longitudinal do ciclo de vida anfídromo desses animais (Bauer, 2011).

1.1.4. Histórico taxonômico

A primeira descrição taxonômica de um espécime do gênero *Atya* foi realizada por Leach (1815), que descreveu um camarão de localidade desconhecida e cunhou o nome *Atys scaber*. O qual, por já estar ocupado, foi alterado um ano depois para *Atya scabra* (Leach, 1816; Villalobos, 1943). Contudo, um “Guaricuru” coletado no Brasil, provavelmente um espécime de *A. scabra* (Lemos de Castro, 1962¹ apud Hobbs & Hart, 1982), já havia sido registrado pelo naturalista Marcgrave (1648) por meio de um relato e uma ilustração (Figura 1C) mais de 150 anos antes, à época das grandes explorações europeias na América e previamente ao estabelecimento de uma classificação biológica padronizada (Godfray, 2002).

Também previamente à descrição de *A. scabra*, a espécie *Cancer* (*Astacus*) *innocous* foi descrita por Herbst (1792² apud Hobbs & Hart, 1982) baseado em um exemplar coletado em Martinica primeiramente descrito e ilustrado por Gronovius (1764³ apud Hobbs & Hart, 1982). Porém essa espécie foi realocada no gênero *Atya* apenas na década de 1960, ficando *Atya innocous* (Herbst, 1792) (Holthuis, 1966). Dessa forma, após o estabelecimento da classificação biológica em sua forma moderna por Linnaeus (Godfray, 2002), e da primeira descrição de um espécime já como *Atya* (Leach, 1816), uma série de novas descrições taxonômicas começaram a ser feitas baseadas em espécimes de diferentes localidades da América e África (revisado por Hobbs & Hart, 1982)

¹Lemos de Castro, A. 1962. Sobre os crustaceos referidos por Marcgrave em sua "Historia Naturalis Brasiliae" (1648). *Arquivos do Museu Nacional*, 52: 37-51.

²Herbst, J.F.W. 1791-1796. **Versuch einer Naturgeschichte der Krabben und Krebse nebst einer systematischen Beschreibung ihrer verschiedenen Arten**, 2. Berlin: Gottlieb August Lange. 266 p.

³Gronovius, T. 1764. *Zoophylacii Gronoviani, fasciculus secundus, exhibens enumerationem Insectorum, quae in museo suo adservat, examini subiecit, systematice disposuit alque descripsit. Part 2.* Leiden. 141-236.

Figura 1: A) Esquema de uma *Atya scabra* com estruturas utilizadas na distinção de um camarão Caridea (I, II e III), Atyidae (IV), e *Atya* [(1), (2), (3), (4) e (5)]. Modificado de Fryer (1977, pag. 60). I: Pleura do segundo segmento abdominal II: terceiro par de pereópodes não quelados, III: filobrânquias, IV: dois primeiros pares de pereópodes com as quelas portando cerdas, (1) carpo do segundo par de pereópodes mais longo do que largo, (2) Ângulos posterolaterais do télson não ultrapassando a margem posterior deste segmento, (3) Terceiro e quarto par de pereópodes mais desenvolvidos, (4) Rostro sem espinhos dorsais, (5) Mero do terceiro par de pereópodes com ornamentações mas nunca com um esporão maciço. *estruturas não visíveis no esquema. B) Exemplar macho de *A. scabra* oriundo de São Fidélis - Rio de Janeiro (Brasil) - CCDB 5257. C) Ilustração do primeiro registro de um espécime do gênero *Atya*, “Guaricuru”. Modificado de Marcgrave (1648, pag.187).

Primeiramente, novos espécimes de camarões coletados no México (Atlântico), nas ilhas de Cabo Verde e Jamaica foram descritos para o gênero como *Atya mexicana* Wiegmann, 1836, *Atya sulcatipes* Newport, 1847 e *Atya occidentalis* Newport, 1847, respectivamente. Quase duas décadas depois, Milne-Edwards (1864) designou os nomes *Atya margaritacea* A. Milne-Edwards, 1864 e *Atya robusta* A. Milne-Edwards, 1864 para espécimes supostamente coletados na Nova Caledônia (provavelmente oriundos da América) (Holthuis, 1966). Em seguida, indivíduos coletados na vertente pacífica da Guatemala foram descritos como *Atya rivalis* Smith, 1871 e *Atya tenella* Smith, 1871, na ocasião também foi descrita *Evatya crassa* Smith, 1871 uma espécie que considerada similar a *Atya*.

Alguns anos depois, *Atya gabonensis* Giebel, 1875 foi descrita para o Gabão e *Atya punctata* Kingsley, 1878 para o Haiti. Outra espécie, proveniente da Bacia do Rio Orinoco (América do Sul setentrional) similar a *Atya gabonensis* e a *Evatya crassa* foi descrita como *Euatya sculptilis* Koelbel, 1884 (= *Evatya sculptilis*) (Hobbs & Hart, 1982). O emprego do nome *Evatya* como um gênero válido (Smith, 1871; Koelbel, 1884), como subgênero de *Atya* (Ortmann, 1895; 1897) ou como sinônimo júnior de *Atya* (Bouvier, 1925; Hobbs & Hart, 1982) variou ao longo dos anos, e será explicitado ao decorrer do texto (revisado por Hobbs & Hart, 1982).

Nos anos seguintes novas espécies foram descobertas no oeste do continente africano. Sem uma localidade precisa, a espécie *Atya sculptata* Ortmann, 1890 foi descrita, e dois espécimes advindos de Camarões foram designados como uma variedade de *A. margaritacea*, sendo nomeada *Atya margaritacea* var. *claviger* Aurivillius, 1898. Por fim, duas novas espécies foram descritas para o oeste da África, *Atya africana* Bouvier, 1904 do Gabão e *Atya intermedia* Bouvier, 1904 de São Tomé e Príncipe. Dessa forma, ao término do século XIX e início do XX já haviam 15 espécies e uma variedade descritas para o que atualmente é considerado o gênero *Atya*.

A primeira revisão deste gênero foi realizada como parte do trabalho sobre Atyidae publicado por Bouvier (1925), que reconheceu sete espécies e sinonimizou outras dez, conforme descrito a seguir com a citação dos sinônimos

entre parênteses: *A. africana*, *A. crassa* (*Euatya crassa*), *A. intermedia*, *A. robusta*, *A. occidentalis* (*A. tenella*), *A. scabra* (*A. mexicana*, *A. punctata*, *A. margaritacea*, *A. sulcatipes*, *A. rivalis* e *A. margaritacea* var. *claviger*), *A. gabonensis* (*Euatya sculptilis* e *A. sculptata*). Trinta anos mais tarde, uma nova espécie, *Atya ortmannioides* Villalobos, 1956 foi descrita na vertente pacífica do México e, posteriormente, *Atya lanipes* Holthuis, 1963 foi descrita para a ilha de São Tomás (Pequenas Antilhas).

Uma nova revisão foi publicada em 1966, que comparou diversas espécies descritas até então, e, como resultado, novas espécies foram reconhecidas ou sinonimizadas conforme descrito, entre parênteses as espécies consideradas sinônimas (Holthuis, 1966): *A. africana*, *A. intermedia*, *A. innocous* (*A. robusta* e *A. occidentalis*), *A. tenella*, *A. scabra* (*A. mexicana*, *A. punctata* e *A. margaritacea*), *A. sulcatipes* (*A. margaritacea* var. *claviger*) e *A. rivalis*. Nesse trabalho, nenhuma menção foi feita para as espécies *A. gabonensis* e *A. crassa*, antes reconhecidas por Bouvier (1925). Seguido a isso, uma nova espécie foi descrita, *Atya dressleri* Abele, 1975, na vertente pacífica do Panamá. Assim, em meados da década de 1970, o gênero *Atya* apresentava dez espécies reconhecidas e oito consideradas sinônimos juniores.

O último estudo de revisão específico sobre *Atya* foi realizado por Hobbs & Hart (1982), no qual foi realizado um extenso levantamento bibliográfico sobre os camarões do gênero e uma minuciosa análise morfológica de diversos espécimes armazenados em mais de dez coleções carcinológicas, diante a qual novas hipóteses taxonômicas foram sugeridas (entre parênteses espécies consideradas sinônimas): *A. africana*, *A. crassa*, *A. dressleri*, *A. gabonensis* (*Euatya sculptilis* e *A. sculptata*), *A. innocous* (*A. robusta*, *A. occidentalis* e *A. tenella*), *A. intermedia*, *A. lanipes*, *A. margaritacea* (*A. rivalis*), *A. ortmannioides*, *A. scabra* (*A. mexicana*, *A. punctata*, *A. sulcatipes*, *A. margaritacea* var. *claviger*), além de descreverem uma nova espécie endêmica de uma caverna em Barbados, *Atya brachyrhinus* Hobbs & Hart, 1982.

Em seguida ao estabelecimento do gênero *Atya*, Chace (1983) revisou exemplares de outros gêneros de atyídeos, todos restritos ao Indo-Pacífico e Austrália, cujas espécies ao longo do tempo foram eventualmente descritas

como *Atya* (e.g. *Atyoida* Randall, 1840; *Atyopsis* Chace, 1983; *Australatya* Chace, 1983). Contudo, uma vez que a distinção (morfológica e molecular) desses táxons em relação à *Atya* é atualmente reconhecida (Chace, 1983; von Rintelen *et al.*, 2012), o histórico taxonômico dessas espécies foi considerado dispensável para os objetivos do presente estudo, e não é aqui explorado.

Nos anos seguintes ao trabalho de Hobbs & Hart (1982), duas novas espécies de *Atya* foram descritas, *Atya abelei* Felgenhauer & Martin, 1983 no Panamá (vertente pacífica) e *Atya limnetes* Holthuis, 1986 no oeste da Colômbia. Além disso, Villalobos-Hiriart *et al.* (2010) coletaram novos espécimes na vertente pacífica do México (Oaxaca) similares à *A. ortmannioides*, os quais devido às diferenças no terceiro par de pereópodes (mais desenvolvido e ornamentado) foram designados como *Atya* sp. 1, mas sem grande avaliação. Isto posto, nos 35 anos posteriores à revisão bibliográfica e taxonômica de Hobbs & Hart (1982), nenhum estudo avaliou especificamente as hipóteses taxonômicas ali presentes, ou sumarizou as informações e o conhecimento produzido pertinentes à sistemática e taxonomia do gênero *Atya*.

1.1.5. Filogenia

Conforme descrito, o gênero *Atya* é filogeneticamente relacionado a outros seis gêneros de atyídeos formando a linhagem “grupo *Atya*” sensu von Rintelen *et al.* (2012). Contudo, a única proposta filogenética com amostragem taxonômica pertinente ao estudo das relações entre as espécies do gênero, a qual incluiu todas as espécies até então reconhecidas, foi realizada por Hobbs & Hart (1982). Nesse estudo, 25 caracteres morfológicos, presentes no rosto, carapaça, antênula, esterno, abdômen, télson e pereópodes, foram utilizados para a construção do cladograma mais parcimonioso encontrado. Porém, como o objetivo do estudo foi identificar as relações evolutivas entre as 11 espécies taxonomicamente reconhecidas no mesmo trabalho, todas as espécies bem como o próprio gênero *Atya* foram implicitamente considerados monofiléticos (Hobbs & Hart, 1982).

Mais recentemente, algumas espécies do gênero foram incluídas em análises filogenéticas com dados moleculares e em contextos evolutivos mais amplos (baixa amostragem taxonômica e de espécimes de *Atya*) como da infraordem Caridea (Bracken *et al.*, 2009) e família Atyidae (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012). Na proposta filogenética mais recente da família Atyidae, o gênero *Atya* não foi recuperado como monofilético (von Rintelen *et al.*, 2012), uma vez que *A. ortmannioides* ficou mais relacionada com espécies de outros gêneros da linhagem “grupo *Atya*” (*Micratya*, *Jonga* e *Potimirim*) do que com as demais espécies amostradas (*A. gabonensis*, *A. innocous*, *A. lanipes*, *A. margaritacea* e *A. scabra*) (von Rintelen *et al.*, 2012).

Uma vez que os estudos filogenéticos com dados moleculares mais recentes (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012), adicionalmente ao histórico de instabilidade taxonômica apresentado (revisado por Holthuis, 1966; Hobbs & Hart, 1982) suscitam questões em relação à sistemática do gênero (possível não monofilia) e de algumas de suas espécies (descritas na seção 1.2), a resolução de tais perguntas continuam dependendo de uma proposta filogenética voltada para gênero *Atya* e de análises focadas nas hipóteses taxonômicas sob questionamento.

1.2. Questões sistemáticas

1.2.1. *A. gabonensis* (África/América)

Conforme citado anteriormente, o táxon *A. gabonensis* foi primeiramente descrito baseado em espécimes coletados no Gabão (Giebel, 1875), e, portanto, considerada uma espécie restrita ao oeste da África. Posteriormente, Ortmann (1895) sinonimizou *Euatya sculptilis* descrita para a bacia do Orinoco na América do Sul (Koelbel, 1884), o que ampliou a distribuição geográfica de *A. gabonensis*, passando a ser considerada anfi-atlântica (Ortmann, 1895; 1897). Contudo, novos registros da espécie em localidades na América do Sul não ocorreram por mais de 80 anos, o que levou autores a questionarem o registro dessa espécie no continente (Bouvier, 1925; Holthuis, 1951).

Apesar dos posteriores registros de *A. gabonensis* realizados para outras localidades da América do Sul (ao longo da costa do Brasil) (Hobbs, 1980; Fonseca, 1994; Ramos-Porto & Coelho, 1998; Melo, 2003), e da ausência de variação morfológica entre espécimes dos dois continentes revisada por Hobbs & Hart (1982), a existência de uma espécie com ampla distribuição geográfica (anfi-atlântica) permaneceu questionada por alguns especialistas, uma vez que exemplares dessa espécie não foram amostrados em levantamentos carcinológicos posteriores na Bacia do Orinoco (Rodríguez, 1982), da probabilidade dos espécimes da América do Sul serem de uma espécie ainda não descrita e possivelmente críptica (informação pessoal)^{1,2} e, ainda, de existir a possibilidade de erros na identificação morfológica dos exemplares americanos (De Grave & Mantelatto, 2013a).

Mais recentemente, um trabalho sobre a filogenia dos atyídeos americanos amostrou dados moleculares de *A. gabonensis* da África e da América do Sul, contudo, apesar da baixa divergência genética encontrada sugerir a existência de uma única espécie de distribuição anfi-atlântica, o único espécime americano amostrado foi adquirido em um pet shop e teve sua origem questionada pelos próprios autores (Page *et al.*, 2008). Assim, uma avaliação sistemática com dados moleculares da espécie *A. gabonensis* continua dependente da geração de novas sequências que complementem a amostragem geográfica pertinente à questão anfi-atlântica.

1.2.2. *A. innocous* (Atlântico/Pacífico)

Como apresentado anteriormente, *A. innocous* tem uma longa história taxonômica e envolve quatro espécies já descritas, a qual foi amplamente revisada por Hobbs & Hart (1982). A descrição da espécie *Cancer* (*Astacus*) *innocous* se baseou no espécime coletado em Martinica previamente descrito e ilustrado por Gronovius (1764³ apud Hobbs & Hart, 1982). Aqui, um breve resumo da história focando nos objetivos do estudo é explorado.

¹Célio Magalhães. **Comentário informal** durante empréstimo de material carcinológico à Mariana Terossi, 2012.

²Lucas Torati **Conversa informal** com o autor do presente estudo durante visita ao Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Crustáceos (LBSC), 2013.

³Gronovius, T. 1764. Zoophylacii Gronoviani, fasciculus secundus, exhibens enumerationem Insectorum, quae in museo suo adservat, examini subiecit, systematice disposuit alique descripsit. Part 2. Leiden. 141-236.

Posteriormente a descrição citada, *A. occidentalis* foi descrita para a Jamaica apesar de considerada semelhante ao apresentado nos desenhos de Gronovius (Newport, 1847). Milne-Edwards (1864) descreveu *A. robusta* para espécimes supostamente coletados na Nova Caledônia (provavelmente oriundos da América, segundo Holthuis, 1966). Finalmente, *A. tenella* foi descrita por Smith (1871) para a vertente pacífica da Guatemala.

Após estas descrições, Bouvier (1925) considerou *A. robusta* como válida e *A. tenella* como sinônimo júnior de *A. occidentalis*, mas sem avaliar *Cancer (Astacus) innocous*. Holthuis (1966) ao analisar essa questão revalidou *A. tenella*, realocou *Cancer (Astacus) innocous* no gênero *Atya* e considerou *A. innocous* um sinônimo sênior de *A. occidentalis* e *A. robusta*. Dessa forma, as hipóteses de apenas duas espécies, *A. innocous*, de distribuição Atlântica (Mar do Caribe) e *A. tenella*, de distribuição Pacífica (restrita na América Central) foram estabelecidas (Holthuis, 1966) e aceitas nos anos seguintes (Chace & Hobbs, 1969; Abele, 1975).

Contudo, após ampla avaliação de espécimes, Hobbs & Hart (1982) sinonimizaram as duas espécies consideradas válidas por Holthuis (1966), estabelecendo a hipótese da existência de apenas uma espécie, *A. innocous*, de distribuição trans-ístmica. Tal decisão foi considerada uma questão pessoal/subjetiva por Holthuis (1986), uma vez que segundo os próprios autores da sinonímia, Hobbs & Hart (1982), a distinção morfológica entre indivíduos de cada vertente era possível na maior parte dos casos. Diante disso, Holthuis (1986) considerou que seria mais lógico e prático manter a distinção de duas espécies separadas pelo istmo do Panamá.

Apesar da interpretação de Holthuis (1986) ter sido seguida por alguns autores nos anos seguintes (Abele & Kim, 1989; Lemaitre & Alvarez-León, 1992), a hipótese de *A. innocous* trans-ístmica proposta na revisão taxonômica minuciosa de Hobbs & Hart (1982) foi majoritariamente reconhecida (Obregón, 1986; De Grave & Fransen, 2011; De Grave *et al.*, 2013b). Visto que as evidências morfológicas até agora investigadas fundamentam duas interpretações distintas (Hothuis, 1986; Hobbs & Hart, 1982), o acréscimo de

dados independentes na investigação podem contribuir com a resolução desse impasse.

1.2.3. A. scabra/A. margaritacea

As espécies *A. margaritacea* e *A. scabra* apresentam históricos taxonômicos antigos (citados anteriormente), localidades tipo indeterminadas nas descrições originais (Leach, 1815; Milne-Edwards, 1864), amplas distribuições geográficas (Hobbs & Hart, 1982), e ainda, apresentam morfologia relativamente similar (Hobbs & Hart, 1982). Dessa forma, naturalmente ao longo do tempo surgiram confusões na identificação e delimitação dessas espécies, fruto de um histórico de muitos eventos taxonômicos, como propostas de nomes distintos para espécimes de diferentes localidades (descrições de espécies), realocações de nomes como sinonímias (revisões) e novos registros de distribuição geográfica (revisado por Holthuis, 1966; Hobbs & Hart, 1982).

Uma vez que a distinção morfológica dessas espécies ficou evidente após a última revisão taxonômica do gênero, a qual estabilizou as hipóteses taxonômicas de *A. margaritacea* e *A. scabra* (Hobbs & Hart, 1982; De Grave & Fransen, 2011), apenas os eventos taxonômicos pertinentes ao presente estudo são apresentados a seguir, sendo que um histórico taxonômico detalhado pode ser consultado em Hobbs & Hart (1982).

Conforme citado, *A. scabra* foi a primeira espécie formalmente descrita como do gênero *Atya* (Leach, 1815; 1816), e, possivelmente, a primeira espécie de *Atya* registrada (Marcgrave, 1648; Lemos de Castro, 1962¹ apud Hobbs & Hart, 1982). O nome *A. scabra* foi cunhado em 1816, mas sua localidade tipo foi esclarecida somente 250 anos depois por Holthuis (1966). Apesar de que o material tipo da espécie não foi recuperado no Museu Britânico (Londres, Reino Unido) por esse autor, ele constatou baseado em etiquetas encontradas que a localidade de origem desse e outros espécimes do mesmo lote possivelmente seria em algum lugar do estado de Veracruz, na vertente atlântica (Golfo do México) do México.

¹Lemos de Castro, A. 1962. Sobre os crustaceos referidos por Marcgrave em sua "Historia Naturalis Brasiliae" (1648). *Arquivos do Museu Nacional*, 52: 37-51.

De acordo com essas informações, Hobbs & Hart (1982) ao estabeleceram a hipótese taxonômica atual de *A. scabra* designaram um neótipo para a espécie, um exemplar da região do município de Misantla (Veracruz, México). Assim, essa espécie apresenta a mais ampla distribuição geográfica do gênero *Atya*, compreendendo a costa mexicana do Golfo do México, ilhas e regiões continentais do Mar do Caribe e ao longo das costas brasileira e africana, incluindo registros na vertente pacífica da América atribuídos a introduções recentes (Hobbs & Hart, 1982; De Grave *et al.*, 2013b).

Por sua vez, *A. margaritacea* também esta entre as espécies de *Atya* taxonomicamente mais antigas, tendo sido descrita em 1864 (Milne-Edwards, 1864). Esse nome foi cunhado na descrição de espécimes com origem presumida na Nova Caledônia (Milne-Edwards, 1864). Contudo, posteriormente foi diagnosticado um provável erro na determinação da origem desses espécimes (Ortmann, 1895), a qual foi atribuída para a América (Holthuis, 1966). Assim, o material tipo existente são os síntipos de *A. rivalis* (= *A. margaritacea*) da Nicarágua (Smith, 1871; Hobbs & Hart, 1982). A hipótese taxonômica atual de *A. margaritacea* (sensu Hobbs & Hart, 1982) fundamenta uma distribuição geográfica ampla ao longo da costa do pacífico da América, do norte do México ao norte do Peru (Hobbs & Hart, 1982; De Grave *et al.*, 2013c).

Apesar da estabilização das hipóteses taxonômicas baseadas em morfologia dessas duas espécies (Hobbs & Hart, 1982), quando dados moleculares foram empregados em estudos de sistemática filogenética da família Atyidae, foi constatada ausência de variação genética entre espécimes de *A. margaritacea* (América Central, Pacífico) e *A. scabra* (Trinidade e Tobago) (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012). Tendo em vista que diante da ausência de divergência genética distinções morfológicas podem ser consideradas plasticidades fenotípicas populacionais (Carvalho-Batista *et al.*, 2014; Robles & Felder, 2015), ressurgiu a questão sobre adequabilidade das hipóteses taxonômicas morfológicas de duas espécies distintas (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012).

Além disso, apesar da hipótese taxonômica atual de *A. scabra* ao longo de sua ampla distribuição geográfica no Mar do Caribe, Brasil e oeste da África

ter sido corroborada em um estudo filogeográfico recente, uma forte estruturação genética entre as populações de *A. scabra* no Golfo do México em relação as demais localidades evidenciou a possibilidade da existência de uma espécie críptica nessa região (Oliveira, 2014; Oliveira *et al.* submetido). Embora considerada morfologicamente indistinguível (Milne-Edwards, 1864; Ortmann, 1890; Villalobos, 1943; Holthuis, 1966; Hobbs & Hart, 1982), uma segunda espécie de *Atya*, *A. mexicana*, já havia sido proposta para o Golfo do México (Wiegmann, 1836), e, uma vez que a localidade tipo de *A. scabra* foi estabelecida também para essa região (Hobbs & Hart, 1982), a avaliação dessa questão é particularmente relevante para a sistemática do grupo.

Portanto, a avaliação das hipóteses taxonômicas baseadas em morfologia realizada por Hobbs & Hart (1982) com dados independentes pode auxiliar na resolução da proposta sistemática dessas espécies, evidentemente quanto à necessidade de sinonímia entre elas, bem como possibilidade da existência de uma espécie críptica no Golfo do México.

1.3. Delimitação molecular de espécies

Enquanto unidades taxonômicas (táxons), espécies são hipóteses sistemáticas de grande importância para a biologia comparada, uma vez que estudos sobre biogeografia e filogenia subsidiam o conhecimento sobre a biodiversidade e sua evolução (Carvalho *et al.*, 2007). Além disso, espécies são utilizadas como unidades fundamentais em diversas disciplinas da Biologia e ciências em geral, sendo que uma delimitação específica inadequada pode propagar erros desde pesquisas básicas até aplicadas, nas mais diversas áreas de estudo, comprometendo inclusive a própria conservação da biodiversidade (Agapow *et al.*, 2004; Bortolus, 2008; Costello *et al.*, 2013).

Tradicionalmente a delimitação taxonômica de uma espécie é uma hipótese fundamentada em um conjunto de características morfológicas discretas, estudadas de maneira minuciosa por especialistas dos grupos taxonômicos em questão, que visam uma hipótese taxonômica consistente (Godfray, 2002; Cook L.J. *et al.*, 2010). Contudo, tem crescido o entendimento

de que a morfologia é apenas um aspecto da diversidade biológica, e de que uma hipótese taxonômica será mais consistente se incluídas diferentes linhas de evidências no seu suporte, como dados comportamentais, ecológicos, biogeográficos e moleculares (De Queiroz, 2007; Goldstein & DeSalle, 2010).

Dentre os dados disponíveis para delimitação de espécies, nas últimas duas décadas o uso do DNA é o método mais frequentemente utilizado de maneira complementar à morfologia, visto que o desenvolvimento de marcadores moleculares e sequenciamento de fragmentos de DNA se tornou uma metodologia relativamente rápida e acessível de disponibilizar centenas de caracteres (nucleotídeos) para a resolução de questões sistemáticas (Hebert *et al.*, 2003a; Avise, 2004; Cook L.J. *et al.*, 2010).

A delimitação de espécies com dados moleculares popularizou-se principalmente a partir da proposta do DNA Barcoding, um sistema que visa facilitar a identificação de espécies por não especialistas dos grupos taxonômicos (Hebert *et al.*, 2003a, b; 2004a, b). Nesse sistema, a identificação específica é feita com um trecho sequenciado do genoma de um organismo, baseada na quantificação do intervalo entre divergências genéticas intraespecíficas e interespecíficas, o *barcode gap* (Hebert *et al.*, 2003a, b; 2004a, b; Waugh, 2007). Por meio da análise das distâncias genéticas é possível identificar não apenas as espécies já descritas e amostradas em bancos de dados genéticos, mas também delimitar aquelas ainda não conhecidas, o que ficou particularmente evidente em casos de espécies crípticas classificadas como um único táxon devido à alta similaridade morfológica (Knowlton, 1986; Hebert *et al.*, 2004b; Bickford, 2006).

Além de similaridade nucleotídica, reconstruções filogenéticas também são utilizadas na sistemática molecular como um método para delimitar espécies (Schubart, 2011; Bracken-Grissom *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2016). A delimitação de espécies baseada no compartilhamento de caracteres em árvores filogenéticas é relevante dentro de uma perspectiva que busca avaliar e propor hipóteses taxonômicas que reflitam linhagens em um contexto evolutivo, confrontando as linhagens evidenciadas às espécies inicialmente reconhecidas (Schubart, 2011; DeSalle *et al.*, 2005).

Ao longo da última década, a sistemática molecular passou a compreender diversas análises próprias para a delimitação de espécies, as quais por meio do estabelecimento de um limite específico tem como objetivo detectar potenciais espécies dentro de um conjunto de dados de maneira automática (Pons *et al.*, 2006; Goldstein & DeSalle 2010; Fujita *et al.*, 2012; Carstens *et al.*, 2013). As potenciais espécies identificadas nesse tipo de análise podem ser consideradas hipóteses secundárias de espécies (HSE), as quais são avaliadas de acordo com as evidências disponíveis frente aquelas já existentes e sob verificação, as hipóteses primárias de espécies (HPE) (Postaire *et al.*, 2016; Arrigoni *et al.*, 2016).

Entre as análises de delimitação molecular de espécies mais utilizadas está o Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012). Baseado no sistema de DNA Barcoding, esse método consiste no agrupamento automático de sequências em potenciais grupos (espécies) de acordo com sucessivos valores de *barcode gap*. Nessa análise, primeiramente é realizada uma comparação par a par da distância genética entre todas as sequências de um alinhamento. Com base nos valores de distâncias ranqueados, o primeiro pico (ponto de inflexão) de variação genética após o valor de *barcode gap* previamente estabelecido é detectado, e utilizado para agrupamento das sequências. Com os grupos formados, análises recursivas são realizadas aumentando o valor do *barcode gap*, visando aguçar a delimitação dos grupos ao permitir diversos limites intra/interespecíficos. As análises recursivas se encerram apenas quando não é mais possível determinar partições naquele conjunto de dados (Puillandre *et al.*, 2012).

Outra forma de se delimitar espécies com dados moleculares consiste nas análises baseadas em árvores filogenéticas que incorporam modelos populacionais de evolução, como a teoria da coalescência (Sites & Marshall, 2003; 2004; Pons *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2012; Carstens *et al.*, 2013). Tais análises buscam inferir o ponto de transição entre processos evolutivos populacionais (eventos coalescentes) e de diversificação (especiação) em uma árvore filogenética (Tang *et al.*, 2014), e, por considerarem a escala onde ocorre a divergência entre as espécies (modelos populacionais e evolutivos), são

considerados ferramentas adequadas para a delimitação dessas (Fujita *et al.*, 2012).

Um dos métodos baseado em coalescência mais recentemente desenvolvido é o Poisson Tree Processes (PTP) (Zhang *et al.*, 2013). Essa análise assume que cada substituição a mais encontrada entre táxons terminais de uma filogenia aumenta a probabilidade de que uma espécie tenha sido gerada. Assim, de acordo com os comprimentos de ramos de uma árvore filogenética, o número de substituições existentes entre os táxons terminais são quantificados, e um limite entre linhagens populacionais e específicas é estabelecido (Zhang *et al.*, 2013). Ou seja, a análise PTP assume que o número de substituições encontrado entre sequências de espécies distintas será maior do que aquele entre sequências de uma mesma espécie (Zhang *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014).

Outra análise baseada em coalescência utilizada na delimitação de espécies é a Generalized Mixed Yule Coalescence (GMYC) (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013). Assim como a análise de PTP, o estabelecimento do ponto limite entre eventos de coalescência e de especiação é o objetivo dessa análise (Pons *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2014). Contudo, no GMYC são utilizados os eventos dicotômicos de um filograma calibrado (com tempos de divergência), ou seja, ao invés do limite específico ser estabelecido pelo número de substituições, aqui ele é definido com base no tempo de divergência em uma árvore ultramétrica, assumindo um modelo de relógio molecular e de diversificação (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013; Tang *et al.*, 2014).

Diante de tantas análises disponíveis para a delimitação de espécies, cada qual assumindo um conjunto de parâmetros e modelos, HSE consistentes devem ser adquiridas por meio do uso integrativo de diferentes análises com dados moleculares confrontados às hipóteses taxonômicas vigentes (Page & Hughes, 2011; Puillandre *et al.*, 2012; Carstens *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014; Postaire *et al.*, 2016; Arrigoni *et al.*, 2016). Sendo que tais resultados podem corroborar tais hipóteses ou identificar incongruências, sendo dependentes e ao mesmo tempo subsidiando revisões taxonômicas (Hebert *et al.*, 2004a, b; Pons

et al., 2006; Schubart, 2011), mas nunca concluindo a investigação ou substituindo a “taxonomia tradicional” por uma “taxonomia molecular” sensu Tautz (2003) (Will *et al.*, 2005; Frézal & Leblois, 2008; Goldstein & DeSalle, 2010; Fujita *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar por meio de dados moleculares as hipóteses taxonômicas das espécies *A. gabonensis*, *A. innocous*, *A. margaritacea* e *A. scabra*, contribuindo na resolução de questões sistemáticas do gênero *Atya*.

2.2. Objetivos específicos

- Reconhecer possíveis linhagens evolutivas referentes às espécies *A. gabonensis*, *A. innocous*, *A. margaritacea* e *A. scabra* em um contexto filogenético;
- Quantificar a divergência molecular entre as linhagens específicas encontradas, delimitando as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas;
- Avaliar o posicionamento filogenético de *A. ortmannioides* em relação ao gênero por meio de dados moleculares;
- Investigar hipóteses específicas por meio de análises de delimitação molecular de espécies;
- Sumarizar o conhecimento sobre o gênero *Atya* pertinente à áreas da sistemática e taxonomia, subsidiando futuras pesquisas sobre esses camarões.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Obtenção dos dados moleculares

3.1.1. Aquisição e identificação de exemplares

Esforços foram reunidos na tentativa de se amostrar o máximo das espécies do gênero *Atya*. Espécimes das espécies foco do presente estudo (*A. gabonensis*, *A. innocous*, *A. margaritacea* e *A. scabra*) foram utilizados buscando-se obter uma amostragem que contemplasse suas distribuições geográficas da maneira mais completa possível, considerando grandes regiões e áreas de interesse biogeográfico (Tabela I, Figura 2).

Alguns dos exemplares analisados estavam disponíveis na Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia (CCDB), da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLRP - USP). Outros espécimes foram obtidos por meio de empréstimos (espécime completo, pereópode ou tecido abdominal) das seguintes instituições: Coleção Carcinológica do Museu de Oceanografia da Universidade de Pernambuco, Recife (MOUFPE), Recife, Brasil; Coleção de Crustáceos do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DZ-UFRGS), Porto Alegre, Brasil; Departamento de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (DZ-PUC-RS), Porto Alegre, Brasil; Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZ-USP), São Paulo, Brasil; Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Rio de Janeiro, Brasil; Colección Nacional de Crustaceos do Instituto de Biología da Universidad Nacional Autónoma de México (CNCR), Cidade do México, México; Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica (MZ-UCR), San José, Costa Rica; Natural History Museum (NHM), Londres, Reino Unido e Naturalis Biodiversity Center (RMNH), Leiden, Holanda. Os exemplares recebidos como doação da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e do Projeto Piabanha foram catalogados e depositados na CCDB.

A identificação dos indivíduos foi realizada sob estereomicroscópio ZEISS (Stemi SV 6) e Leica (DM 1000) utilizando as chaves de identificação de Chace & Hobbs (1969) e Hobbs & Hart (1982), de acordo com os caracteres morfológicos diagnósticos de cada espécie.

Tabela I (continua): Relação dos espécimes utilizados nas análises moleculares e dados de coleta, inclui espécies do gênero *Atya*, outras espécies da linhagem grupo *Atya* (A), espécies de outras linhagens de Atyidea [grupo *Caridella* (C) grupo *Paratya* (P), grupo *Typhlatya* (T) e grupo *Syncaris* (S)] e um Xiphocarididae. Linhagens de Atyidae segundo von Rintelen *et al.* (2012). A coluna “nº Mapa” se refere ao código de numeração presente na Figura 2. Os números de “Coleção/Lote” são apresentados apenas para os espécimes cujas sequências são inéditas desse estudo (em negrito). Em itálico sequências com tamanhos menores que as obtidas no presente estudo (ver pags. 31 e 32). CCDB: Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto; MZ-USP: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; RMNH: Naturalis Biodiversity Centre; CNCR: Colección Nacional de Crustáceos; MZ-UCR: Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica. GB: Genbank. Marcadores moleculares - 16S: Subunidade Ribossomal 16S. COI: Citocromo Oxidase I. H3: Histona H3. Autores descritores: ¹ (Millet, 1831) ² Randall, 1840 ³ (Newport, 1847) ⁴ (De Haan, 1849) ⁵ (McCulloch & McNeill, 1923) ⁶ Yü, 1938 ⁷ Holthuis, 1963 ⁸ (Bouvier, 1909) ⁹ Karge *et al.*, 2013 ¹⁰ (De Haan, 1844) ¹¹ Kemp, 1917 ¹² (Müller, 1881) ¹³ (Holmes, 1895) ¹⁴ H.H.III Hobbs & H.H.Jr. Hobbs, 1976 ¹⁵ (Guérin-Méneville, 1855). Referências sequências Genbank: ^a Page *et al.* (2008) ^b Cook B.D. *et al.* (2010) ^c von Rintelen *et al.* (2012) ^d Santos & Weese (2011) ^e Schoolmann *et al.* (2015) ^f Cook *et al.* (2006) ^g Page *et al.* (2007a) ^h Page *et al.* (2007b) ⁱ Page & Hughes (2014) ^j Oliveira *et al.* (submetido).

Espécie	nº Mapa	Localidade	16S	COI	H3	Coleção/Lote
<i>Atya gabonensis</i>	1	Oeste da África	EF489989 ^a	<i>EF489962^a</i>	FN995461 ^c	GB
	2	Edéa, Camarões	KY582524	KY582534	KY582550	RMNH 46876
	3	Nigéria ou Camarões	KY582523	KY582535	KY582551	RMNH 51665
	4	África ou América do Sul	EF489989 ^a	-	FN995460 ^c	GB
	5	São Fidélis, Rio de Janeiro, Brasil	KY582522	KY582536	KY582552	CCDB 5256
	6	Brokopondo, Suriname	KY582521	KY582537	KY582553	RMNH 20007
	7	Registro, São Paulo, Brasil	KY582520	KY582538	-	MZ-USP 11443
	8	Poço Redondo, Sergipe, Brasil	-	-	KY582554	CCDB 5876
<i>Atya innocous</i>	1	Porto Rico	EF489987 ^a	EF489968 ^a	-	GB
	2	Tobago	EF489988 ^a	EF489969 ^a	-	GB
	3	Montezuma, Puntarenas, Costa Rica	KY582518	KY582526	KY582544	CCDB 2848
	4	Puerto Cortes, Puntarenas, Costa Rica	-	KY582527	-	CCDB 2848
			KY582517	KY582528	KY582545	MZ-UCR 2969-01

Tabela I (continuação)

Espécie	nº Mapa	Localidade	16S	COI	H3	Coleção/Lote
<i>Atya margaritacea</i>	1	Cidade do Panamá, Panamá	KY582515	KY582530	KY582547	CCDB 2406
			KY582516	KY582531	KY582548	CCDB 2406
	2	Concordia, Sinaloa, México	KY582514	KY582532	KY582549	CNCR 25063
	3	San Miguel del Puerto, Oaxaca, México	-	KY582533	-	CNCR 24804
	4	América Central, Pacífico	EF489983 ^a	EF489963 ^a	FN995462 ^c	GB
<i>Atya scabra</i>	1	Huimanguillo, Tabasco, México	KM670935 ⁱ	KM670998 ^j	KY582555	GB /CNCR 17248
	2	Huehuetla, Puebla, México	KM670937 ^j	KM670996 ^j	KY582556	GB /CNCR 5808
	3	Limbe, Camarões	KX522606 ⁱ	KM670990 ^j	KY582557	GB /RMNH 45557
	4	Kribi, Camarões	KM670934 ⁱ	KM670992 ^j	KY582558	GB /RMNH 45558
	5	Reserva Veragua, Limón, Costa Rica	-	KM670979 ^j	KY582559	GB /CCDB 4381
	6	Bocas del Toro, Isla Colón, Panama	KM670931 ⁱ	KM670986 ^j	KY582560	GB /CCDB 2846
	7	Saint Catherine, Jamaica	KM670930 ^j	KM670987 ^j	KY582561	GB /RMNH 17870
	8	Tobago	EF489983 ^a	EF489965 ^a	-	GB
	9	Guanacaste, Costa Rica	KY582512	KM670985 ^j	KY582562	GB /MZ-UCR 2521
	10	La tигра, San Carlos, Costa Rica	KY582513	-	-	MZ-UCR 2056
	11	Poço Redondo, Sergipe, Brasil	KX522605 ⁱ	KX522614 ^j	KY582563	GB /CCDB 5748
	12	São Sebastião, São Paulo, Brasil	KM670921 ⁱ	KM670943 ^j	KY582564	GB /CCDB 2852
<i>Atya dressleri</i>	-	Potrero Grande, Puntarenas, Costa Rica	KY582511	-	-	MZ-UCR 2702-01
<i>Atya intermedia</i>	-	Annobón, Guiné Equatorial	-	KY582529	KY582546	RMNH 15894
<i>Atya lanipes</i>	-		KY582510	-	KY582540	CCDB 2030
	-	Porto Rico	-	EU005053 ^b	-	GB
	-		-	-	KY582539	CCDB 2030
	-		-	EF489970 ^a	-	GB

Tabela I (conclusão)

Espécie	nº Mapa	Localidade	16S	COI	H3	Coleção/Lote
<i>Atya</i> aff. <i>ortmannioides</i>	-	Santiago Astata, Oaxaca, México	KY582519	KY582525	KY582543	CNCR 8780
	-	México	EF489993 ^a	-	FN995463 ^c	GB
<i>Atya</i> <i>ortmannioides</i>	-	Ayutla de los Libres, Guerrero, México	-	-	KY582541	CNCR 8780
	-		-	-	KY582542	CNCR 8780
<i>Atyaephyra desmarestii</i> ¹ (P)	-	Málaga, Espanha	FN995354 ^c		FN995466 ^c	GB
	-	França	-	<i>KP159510</i> ^e	-	GB
<i>Atyoida bisulcata</i> ² (A)	-	Hawaii, EUA	-	-	FN995469 ^c	GB
<i>Atyoida pilipes</i> ³ (A)	-	Vanuatu	DQ681277 ^h	-	-	GB
<i>Atyopsis moluccensis</i> ⁴ (A)	-	Indo-Pacífico	DQ681281 ^h	-	FN995473 ^c	GB
<i>Australatya striolata</i> ⁵ (A)	-	Nova Gales do Sul, Austrália	AY795035 ^f		FN995474 ^c	GB
	-	Queensland, Austrália	-	<i>JX913901</i> ⁱ	-	GB
<i>Caridina cantonensis</i> ⁶ (C)	-	Hong Kong	DQ478487 ^g	-	FN995476 ^c	GB
<i>Halocaridina rubra</i> ⁷ (T)	-	Hawaii, EUA	FN995368 ^c	<i>HM137556</i> ^d	FN995500 ^c	GB
<i>Jonga serre</i> ⁸ (A)	-	Tobago	EF490003 ^a	-	FN995502 ^c	GB
<i>Micratya cook</i> ⁹ (A)	-	Porto Rico	EF489991 ^a	FJ348924 ^b	FN995511 ^c	GB
<i>Neocaridina denticulata</i> ¹⁰ (C)	-	Hawaii, EUA	FN995377 ^c	-	FN995515 ^c	GB
<i>Paratya australiensis</i> ¹¹ (P)	-	Queensland, Austrália	EF490007 ^a	<i>AY641771</i> ^f	FN995525 ^c	GB
<i>Potimirim potimirim</i> ¹² (A)	-	Panamá	EF490004 ^a	<i>EF489975</i> ^a	FN995529 ^c	GB
<i>Syncaris pacifica</i> ¹³ (S)	-	Califórnia, EUA	FN995389 ^c	-	FN995534 ^c	GB
<i>Typhlatya mitchelli</i> ¹⁴ (T)	-	Yucatán, México	FN995393 ^c	-	FN995538 ^c	GB
<i>Xiphocaris elongata</i> ¹⁵	-	Porto Rico	EF490011 ^a	EU004940 ^b	FN995543 ^c	GB

Figura 2: Localidades de origem dos espécimes utilizados nas análises moleculares e distribuição geográfica das espécies foco do presente estudo [revisado por Hobbs & Hart (1982), De Grave & Mantelatto (2013a), De Grave *et al.* (2013b, c e d)]. Numeração conforme Tabela I.

3.1.2. Isolamento do DNA

Os procedimentos adotados para extração de tecido e isolamento de DNA do material da CCDB ou recém coletados (doações) seguiram o protocolo de Mantelatto *et al.* (2006) e Robles *et al.* (2007), com pequenas modificações conforme descrito a seguir. O DNA genômico e mitogenômico foi isolado por um processo de extração salina a partir da extração do tecido abdominal e/ou dos pereópodes dos espécimes. Nesse procedimento, as membranas das células do tecido muscular são rompidas por meio da lise realizada durante 48h de incubação (55°C) em uma solução de 600 µl de tampão de lise e 200 µl de Proteinase K (500µg/ml), liberando as moléculas de DNA na solução. Em seguida, ocorre a adição de 200 µl de um sal concentrado (acetato de amônio [7,5 M]), que separa o DNA aquoso do restante das proteínas existentes na solução por meio de uma centrifugação a 14.000 rpm (18°C) por 10 min. Posteriormente, o DNA é precipitado em 600 µl de isopropanol resfriado (-20°C) e mantido durante ao menos 24h em baixa temperatura (-20°C). Por fim, o *pellet* resultante passa por uma lavagem com 40 µl de etanol 70%, é liofilizado (30-60°C) e ressuspendido em 20 µl de tampão TE.

Amostras de tecido obtidas de material emprestado das demais coleções carcinológicas poderiam ter passado por preservação em formaldeído. Portanto, tais amostras passaram por uma etapa adicional previamente à etapa de digestão do tecido seguindo protocolos de Shedlock *et al.* (1997) modificados por Pileggi (2009). Tal passo consiste em três lavagens sucessivas (2h, 2h e 12h) com 700 µl de tampão GTE [4,5g de dextrose; 6,25 mL Tris-HCl 1M (pH 7,5); 5,0 mL EDTA 0,5M (pH 8,0) e ~200 água destilada e deionizada (H₂O ultrapura)]. O GTE serve como agente de ligação ao formaldeído (Shedlock *et al.*, 1997). As lavagens com o tampão são seguidas por uma lavagem em 200 µl de etanol 100% por 1 min. Por fim, 700 µl de água ultrapura é utilizado para lavar o tecido e demais soluções residuais. Entre cada etapa de lavagem é realizada uma centrifugação de 3-5 min (18°C) a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado.

Também foram realizadas tentativas de extrações de DNA seguindo um protocolo distinto específico para amostras preservadas em formaldeído, o Tetrametilsilano (TMS) - Chelex® 100 - Molecular Biology Grade Resin, descrito

por Palero *et al.* (2010) e adaptado para o material do presente estudo conforme descrito a seguir. O tecido extraído é deixado na temperatura ambiente (~21°C) durante 1 h em 80 µl de TMS. Em seguida a solução centrifugada por 3 min (18°C) e o TMS descartado. Posteriormente, 200 µl de uma solução de Chelex (5%) mais 10 µl de proteinase K (20 mM) é adicionada ao tecido e incubada por 12 h (55°C). Após esse passo, a temperatura das amostras é elevada (95°C) durante 3 min e refrigerada no freezer (-20°C) por 10 min, para interromper a atividade enzimática da proteinase K. Após centrifugação de 3 min (18°C) a 14.000 rpm, o sobrenadante (contendo DNA) é coletado e armazenado em um freezer (-20°C). Ao término dos processos de isolamento, todas as amostras tiveram a qualidade do DNA avaliada e a concentração do DNA quantificada no Espectrofotômetro Nanodrop 2000®.

3.1.3. Escolha e amplificação dos marcadores

Dois trechos de DNA mitocondrial (mDNA) foram selecionados para o objetivo de delimitar espécies, visto que marcadores do mDNA são eficazes no nível específico devido a sua rápida taxa de mutação (Brown *et al.*, 1979; Moritz *et al.*, 1987; Ballard & Whitlock, 2004). A combinação de um fragmento do gene estrutural da Subunidade Ribossomal 16S (16S) e um fragmento do gene codificante Citocromo Oxidase I (COI) é a mais popular em estudos de sistemática no nível específico com crustáceos decápodes (Silva *et al.*, 2011) e têm sido eficaz em estudos com objetivos similares (Klotz & von Rintelen, 2014; Magalhães *et al.*, 2016; Phiri & Daniels, 2016; Vera-Silva *et al.*, 2016).

Além disso, o grande número de cópias de mDNA presente em cada célula dos organismos facilita os processos de obtenção de sequências, a presumida neutralidade é oportuna à perguntas sistemáticas, bem como a herança materna (haploide) e ausência de recombinação facilitam a análise das sequências e interpretação dos dados devido a ausência de íntrons e variação alélica (heterozigotos) (Ballard & Whitlock, 2004; Hill, 2016; revisado por Galtier *et al.*, 2009 e James *et al.*, 2016).

Adicionalmente, devido a importância de se incluir a avaliação das hipóteses taxonômicas em um contexto filogenético (Schubart, 2011; Bracken-Grissom *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2016) e de se incluir marcadores moleculares com heranças distintas como fonte independente de avaliação sistemática (Moore, 1995; Nichols, 2001; Palero & Crandall, 2009; Timm & Bracken-Grissom, 2015), um fragmento da região promotora do gene nuclear (nDNA) que codifica a histona H3 (H3) foi selecionado.

Esse gene pode ser informativo em níveis hierárquicos mais inclusivos como famílias e gêneros (Palero & Crandall, 2009; Timm & Bracken-Grissom, 2015), mas também tem sido utilizado em estudos com objetivos similares ao do presente estudo em níveis específicos (Olguín & Mantelatto, 2013; Rossi & Mantelatto, 2013), sendo eficaz também na distinção de espécies (Miranda *et al.*, 2014). Os três fragmentos de genes, 16S, COI e H3, tem elevada taxa de sucesso na amplificação, e, usados em conjunto, resolução eficaz em relação às questões sobre sistemática de camarões carídeos (Aznar-Cormano *et al.*, 2015).

A amplificação das regiões de interesse foi realizada em reações de PCR, técnica que aumenta exponencialmente a quantidade de fragmentos da região alvo de sequenciamento. As reações de PCR apresentaram volume total de 25 µL com as seguintes concentrações de reagentes: 4-6 µL de H₂O ultrapura; 5 µL de betaína (5 M) (Acrós Organics); 4 µL de dNTP's (10 mM); 3 µL de 10x Taq Buffer (Thermo Scientific); 3 µL de MgCl₂ (25 mM); 2,5 µL de albumina bovina (BSA) 1% (Sigma); 1 µL de cada primer específico (10 ou 20 µM); 0,5 µL *Thermus aquaticus* polimerase (5 U/µL) (Thermo Scientific) e 1 µL de DNA isolado (concentrações de 40-100 ng).

Os ciclos termais foram realizados em Termocicladores Veriti® (Applied Biosystems) e, assim como e conjuntos de primers específicos, variaram de acordo com o fragmento de gene de interesse (Tabela II), ao término, as amostras permaneciam em *holding* a 4°C até serem retiradas do termociclador, quando ficavam armazenas a -20°C.

O sucesso das amplificações foi verificado por meio de corridas de eletroforese em gel de agarose 1,4%. A comparação visual das bandas de peso molecular conhecido com as de um marcador (*ladder*) foi feita a partir de

fotografias tomadas (câmera digital C-7070 da Olympus®) das amostras de DNA (produtos de PCR) misturadas ao marcador fluorescente Gel Red® iluminadas por luz ultravioleta em um transiluminador UV Transiluminator M20 da UVP®.

Tabela II: Ciclos termais (PCR), conjunto de primers e referência dos marcadores moleculares utilizados para amplificação dos fragmentos genéticos alvo. Marcadores moleculares - 16S: Subunidade Ribossomal 16S. COI: Citocromo Oxidase I. H3: Histona H3.

Fragmento de gene		16S	COI	H3
PCR	Desnaturação inicial	4-5 min (95°)	2-4 min (94°)	5 min (95°)
	Desnaturação	45-50 seg (95°)	45 seg (94°)	45 seg (95°)
	35-40x (ciclos) Pareamento	45-70 seg (42-48°)	45-60 seg (49-55°)	45 seg (48-52°)
	Extensão	60-75 seg (72°)	60-70 seg (72°)	60 seg (72°)
	Extensão final	5-8 min (72°)	3-5 min (72°)	5 min (72°)
Primers	<i>Foward</i>	16Sbr (CCGGTCTGAACT CAGATCACGT)	AtyaPL (CAGAGCTMGGAC AACCAGGYAGAT)	H3af (ATGGCTCGTACC AAGCAGACVGC)
	<i>Reverse</i>	16Sar (CGCCTGTTTATC AAAAACAT)	AtyaCR (GCAGATGTAAAGT AGGCTCG)	H3ar (ATATCCTTRGGC ATRGTGAC)
	Referência	Palumbi & Benzie (1991)	Page <i>et al.</i> (2013)	Colgar <i>et al.</i> (1998)

3.1.4. Purificação e sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR que amplificaram a possível região de interesse foram então purificados com o Kit de Purificação SureClean Plus® (Bioline USA Inc.) de acordo com protocolo do fabricante. Nesse procedimento o produto de PCR é misturado com 20 µl do kit de purificação SureClean® e deixado em descanso por 30 min (~21°C). Em seguida, as amostras são centrifugadas a 14.000 rcf (8°C) por 30 min. O sobrenadante é descartado e o *pellet* resultante lavado em uma etapa de adição de 40 µl de etanol 70% seguido de nova centrifugação (igual à anterior). Finalmente, ao término do procedimento de purificação, com a secagem no Concentrator 5301 Eppendorf®, os *pellets* são ressuspensos em 42 µl de H₂O ultrapura. A concentração de DNA da amostra foi então qualificada e quantificada no Espectofotômetro NanoDrop 2000®.

As amostras de DNA purificadas foram enviadas ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica do Departamento de Tecnologia da Faculdade

de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Na FCAV, previamente ao sequenciamento, uma nova etapa de amplificação do fragmento de gene foco foi realizada com o kit Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) (reação/PCR de sequenciamento). Posteriormente, de acordo com recomendações do fabricante, as amostras de DNA foram precipitadas e desnaturadas para passarem pelo processo de sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.1.5. Edição e alinhamento das sequências

A edição das fitas foi realizada no programa Bioedit 7.2.5 (Hall, 2005) e consistiu da inspeção manual dos eletroferogramas (avaliação da altura e espaçamento dos picos) na qual a região dos primers e de má qualidade de sequenciamentos (as pontas) eram deletadas. Após edição de ambas as fitas (senso e anti-senso), uma fita consenso foi gerada com os parâmetros padrões do algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado no Bioedit. Em seguida, com a finalidade de verificar possíveis contaminações, as fitas consenso eram comparadas com o banco de dados de sequências nucleotídicas Genbank (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em: jan/2017) no sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>> Acesso em: dez/2016).

Devido a possibilidade de amplificação de pseudogenes (Moritz *et al.*, 1987; Zhang & Hewitt, 1996), comuns em artrópodes (Buhay, 2009) incluindo crustáceos decápodes (Schubart, 2009; Silva *et al.*, 2011), além do uso de primers específicos e geração de árvores de genes separadamente (explicado adiante), foi realizada, no programa Geneious 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012), a tradução das sequências de nucleotídeos dos genes codificantes (identificando presença de stop-códons). Todo o material testemunho do qual as sequências foram obtidas e utilizadas nas análises encontram-se depositados na coleção de origem, e as sequências originais desse trabalho estão disponíveis para acesso no banco de dados de sequências genéticas do Genbank (Tabela I).

Com objetivo de obter uma matriz de dados mais completa e adequada ao objetivo do presente estudo, sequências disponíveis no Genbank foram utilizadas em conjunto com as sequências consenso inéditas desse trabalho. Dessa forma, outros espécimes de *Atya* e de camarões atyídeos não pertencentes ao gênero foram incluídos nas análises (Tabela I).

A escolha dos táxons a serem utilizados nas análises foi realizada de acordo com as filogenias moleculares disponíveis da infraordem Caridea (Bracken *et al.*, 2009) e da família Atyidae (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012). Nessa etapa, procurou-se incluir representantes filogeneticamente relacionadas ao gênero pertencentes a linhagem do grupo *Atya* e pelo menos dois representantes de cada uma das outras linhagens da família Atyidae conhecidas sensu von Rintelen *et al.* (2012) (Tabela I). Vale ressaltar que os espécimes dos quais foram obtidas as sequências no Genbank não passaram por avaliação/identificação morfológica.

Os alinhamentos finais das sequências consenso inéditas somados às sequências extraídas do Genbank foram realizados separadamente (por genes) utilizando parâmetros padrões com o programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004) implementado no programa Geneious. Após a hipótese de homologia ser estabelecida, uma nova checagem (visual) de cada um dos alinhamentos (16S, COI e H3) foi realizada, na qual os sítios polimórficos e *gaps* (no caso do 16S) foram verificados individualmente analisando os eletroferogramas de ambas as fitas sequenciadas de cada amostra, em busca de possíveis erros de leitura no sequenciamento que geram picos ambíguos ou ilegíveis, bem como *gaps* inexistentes que podem ser gerados pelo algoritmo de alinhamento. Em ambos os casos os erros foram manualmente corrigidos.

O gene COI resultou em um alinhamento com uma menor quantidade de táxons terminais devido à menor disponibilidade no Genbank de sequências cujos trechos (fragmentos de genes) amplificados nos diversos trabalhos fossem conciliáveis com os fragmentos amplificados pelos primers utilizados nesse estudo (específicos do gênero). Contudo, algumas sequências desse gene que apresentaram ao menos 50% de sobreposição foram utilizadas nas análises

filogenéticas (indicados em *itálico* na Tabela I). As hipóteses de homologia nessas sequências foram analisadas cautelosamente de forma a se evitar erros devido ao algoritmo de alinhamento (Deepak & Harikrishnan, 2016).

3.2. Análises

3.2.1 Construção de árvores filogenéticas

Previamente às análises de filogenia, com a finalidade de verificar uma possível saturação dos dados (Xia & Lemey, 2009; Qian *et al.*, 2011), o teste de saturação de Xia *et al.* (2003) implementado no programa Dambe 6.4.4 (Xia, 2013) foi conduzido separadamente para o alinhamento de cada fragmento de gene. Um fragmento de DNA é considerado saturado quando o acúmulo de mutações em um mesmo sítio nucleotídico leva ao compartilhamento de caracteres entre indivíduos por homoplasia e não à existência de um ancestral comum (homologia), implicando em perda de informação filogenética e distorções nas hipóteses de parentesco (Xia & Lemey, 2009; Qian *et al.*, 2011). Além disso, a composição nucleotídica e quantidades de sítios idênticos e variáveis (substituições) foram calculados no MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Para os três fragmentos de genes (16S, COI e H3) foram construídas árvores filogenéticas separadamente e com os três genes concatenados por máxima verossimilhança (em inglês Maximum Likelihood - ML) (Felsenstein, 1973; 1981) e inferência bayesiana (em inglês Bayesian Inference - BI) (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Todas as árvores geradas pelos métodos de ML e BI foram visualizadas e editadas no programa Fig Tree 1.4.2 (Rambaut, 2009).

Nas análises concatenadas algumas sequências oriundas de espécimes distintos foram combinadas e passaram a representar uma unidade taxonômica operacional (em inglês Operational Taxonomic Unit - OTU) (Tabela I). Isso foi feito com objetivo de ter o conjunto de dados mais homogêneo e reduzir efeito de *missing data* de indivíduos que seriam representados por apenas um ou dois genes na análise. As OTU's "*A. scabra* (Huimanguillo, Tabasco, México)" e "*A. scabra* (São Sebastião, São Paulo, Brasil)" foram formadas pela junção de genes

oriundos de espécimes distintos de um mesmo lote. As OTU's "*Micratya cooki*" e "*A. lanipes*" foram formadas por espécimes distintos de uma mesma localidade. As OTU's "*Atyaephyra desmarestii*", "*Australatya striolata*" e "*A. gabonensis* (Brasil)" foram resultado da junção de sequências obtidas de indivíduos de localidades distintas. Já a OTU "*Atyoida* spp.", que será indicada nos filogramas, agrupa sequências de espécies distintas do mesmo gênero. Todas as demais OTU's são compreendidas por sequências obtidas de um mesmo espécime.

As análises filogenéticas de ML foram realizadas no programa RAXML 8.0.0 (Randomised Accelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2014) implementado online na plataforma Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) (RAXML-HPC2 on XSEDE) (Disponível em: <<https://www.phylo.org/>> Acesso em: jan/2017; Miller *et al.*, 2010). O modelo de substituição de nucleotídeos padrão implementado no programa foi utilizado, Generalised Time Reversible (GTR), um modelo geral que assume frequências nucleotídicas distintas, taxas de substituição independentes e matriz de substituição simétrica (Hasegawa *et al.*, 1985), com distribuição gama (+G).

As consistências das topologias das árvores com maiores probabilidades (*Best tree*) foram avaliadas pelo método de pseudo-réplicas bootstrap (Felsenstein, 1985). A determinação do número de pseudo-réplicas necessários para as análises probabilísticas foram automaticamente calculados pelo método de Rapidbootstrap (Stamatakis *et al.*, 2008), seguindo as recomendações do desenvolvedor e sob o modelo GTRGAMMA. Na análise com dados concatenados cada fragmento de gene foi considerado como uma partição distinta.

A reconstrução filogenética por BI foi realizada no programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012). O modelo de substituição dessa análise foi determinado de acordo com a maior probabilidade posterior estimadas para cada gene pelo Bayesian Information Criterion (BIC) com o programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012) implementado online na plataforma CIPRES (jModelTest2 on XSEDE). Foram realizadas duas corridas independentes com quatro cadeias (três "aquecidas" e uma "fria") e 20^6 (16S, COI e H3) ou 25^6 (concatenada) gerações. Os parâmetros foram salvos a cada 5.000 simulações. O suporte das

topologias foi acessado por meio das probabilidades posteriores, método de Cadeias de Markov e simulação de Monte Carlo (em inglês Monte Carlo Markov Chain - MCMC).

Ao fim, a convergência dos parâmetros e probabilidades das corridas foram verificados no programa Tracer 1.6.0 (Rambaut *et al.*, 2014). Para sumarizar a distribuição posterior, a árvore de máxima credibilidade foi recuperada do total de árvores posteriores e os valores de suporte dos ramos anotados no programa TreeAnnotator 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Do total de árvores (e parâmetros) os primeiros 15% das corridas foram descartadas (*burn-in*).

3.2.2. Matrizes de distância genética

As divergências genéticas foram calculadas para cada gene individualmente no programa MEGA. O modelo de substituição mais apropriado para cada fragmento de gene foi selecionado entre os modelos implementados na busca de melhor modelo de substituição de nucleotídeos disponível no próprio MEGA. Assim, de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC) e o BIC, os modelos mais adequados para cada matriz de gene foram estimados utilizando o JModeltest como descrito acima. Foram utilizados aqueles mais adequados dentre os disponíveis para análises de distância do programa MEGA, assumindo homogeneidade nas taxas de substituição dos sítios nucleotídicos ao longo das sequências.

Devido a sensibilidade da análise de distância para *missing data*, a análise foi configurada para eliminar previamente da etapa de comparação par a par entre as sequências (*pairwise comparison*), todos os sítios (*locus*) de cada alinhamento que apresentavam mais de 5% de *missing* ou *ambiguous data* (95% *partial deletion*). Pelo mesmo motivo, no caso do alinhamento do gene COI, as sequências com menos de 95% de sobreposição em relação à maioria foram previamente excluídas (indicados em itálico na Tabela I).

Nas matrizes de distâncias genética calculadas, as amostras das espécies de *Atya* foram agrupadas de acordo com as linhagens encontradas nas

análises filogenéticas aqui apresentadas. Dessa forma, o objetivo foi quantificar a divergência genética entre linhagens filogenéticas evidentes, em detrimento de hipóteses taxonômicas prévias. Além disso, os espécimes de outros gêneros de *Atyidea* foram agrupados em “grupo *Atya*” e “outros *Atyidae*” sensu von Rintelen *et al.* (2012).

3.2.3. Delimitação molecular de espécies

Três análises de delimitação de espécies independentes foram realizadas: Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012), Poisson-Tree-Processes (PTP) (Zhang *et al.*, 2013) e Generalized Mixed Yule Coalescence (GMYC) (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013). Tais análises são consideradas eficazes com o uso de apenas um marcador, geralmente o COI (*single-locus*) (Pons *et al.*, 2006; Puillandre *et al.*, 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

O gene COI foi selecionado para realização dessas análises apesar do conjunto de primers específicos para gênero *Atya* aqui empregados (Page *et al.*, 2013) não ser especificamente o da região proposta para o DNA Barcoding (Hebert *et al.*, 2003a). Esse gene é o mais eficaz na identificação de crustáceos decápodes em nível específico (revisado por Silva *et al.*, 2011), bem como tem resolução adequada conhecida para determinação de espécies do gênero (Page *et al.*, 2008; Oliveira, 2014; Oliveira *et al.* submetido).

A análise de ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) foi realizada em plataforma online (Disponível em: <<http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>> Acesso em: jan/2017). Os parâmetros empregados foram: $P_{\min} = 0,001$ e $P_{\max} = 0,1$; steps = 10 e Nb bins = 6. O parâmetro X (*relative gap width*) foi configurado para 2,0 e o modelo de substituição K2P (Kimura, 1980), baseado no *barcode gap* de 2% (K2P) sugerido para crustáceos decápodes (Silva *et al.*, 2011). Por sua vez, na análise de PTP (Zhang *et al.*, 2013) uma árvore construída com modelos evolutivos, a de ML do gene COI (não enraizada), foi utilizada como *input*, seguindo recomendações de (Tang *et al.*, 2014). Os parâmetros utilizados foram 10^5 gerações de MCMC com um valor de *thinning* de 100, 15% de *burn-in*

e a convergência da corrida foi visualmente observada conforme recomendado por (Zhang *et al.*, 2013). Essa análise também foi realizada em plataforma online própria (Disponível em: <<http://species.h-its.org/ptp/>> Acesso em: jan/2017).

Por fim, o método GMYC requer uma árvore ultramétrica como *input* (Fujita *et al.*, 2012), a qual foi executada do programa BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012) seguindo recomendações de Tang *et al.* (2014). O arquivo de entrada desse programa foi gerado no BEAUti 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Os *priors* de Yule Processes (ramificações da árvore ocorrendo a uma taxa de especiação constante e sem existência de extinções) baseado no Yule model (Yule, 1925), e um relógio estrito (mutações acumulando de maneira constante e igual ao longo da árvore) foram assumidos. A taxa de substituição escolhida foi de 0,007 baseada na taxa de divergência de 1,4% por milhões de anos estimadas por Knowlton & Weigt (1998), considerando a separação de espécies de camarões carídeos da família Alpheidae após o fechamento do istmo do Panamá há aproximadamente 3,2 milhões de anos (revisado por O'Dea *et al.*, 2016).

A corrida foi de 10^6 gerações de MCMC com uma frequência de amostragem de 1.000 e atingiu a convergência esperada conforme observado posteriormente programa Tracer. Utilizando o Tree Annotator uma árvore de máxima credibilidade foi gerada com 15% de *burn-in*. Com a árvore obtida, foram realizadas as análises de GMYC (*single threshold*) (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013) com o pacote “SPLITS” (Species Limits by Threshold Statistics) (Ezard *et al.*, 2009) no programa R Studio 3.3.2 (R Development Core Team, 2013).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de dados moleculares

Com exceção de uma espécie, *A. abelei*, as demais espécies do gênero tiveram ao menos o tecido obtido e passaram por processo de isolamento de DNA (Tabelas I e III). Contudo, não foi possível obter DNA de boa qualidade, amplificação de fragmentos genético alvo ou sequências legíveis para parte do material obtido. Assim, as espécies *A. africana*, *A. brachyrhinus*, *A. crassa* e *A. limnetes* não tiveram dados moleculares amostrados. Em outros casos não foi possível obter sequências para todos os marcadores moleculares (fragmentos de genes) escolhidos (Tabela I).

Foram geradas 55 novas sequências (16S=15, COI=14, H3=26) de oito das 13 espécies reconhecidas atualmente para o gênero *Atya*, sendo que para duas dessas espécies (*A. dressleri* e *A. intermedia*) não havia registros prévios no Genbank (Tabela I). As matrizes finais de cada gene (alinhamentos) apresentaram 533 pares de base (pb) (16S), 768 pb (COI) e 328 pb (H3), totalizando 1629 pb na análise concatenada.

O alinhamento do gene 16S apresentou 435 sítios invariáveis (SI) (81,6%), 35 com transições (ts) e 24 com transversões (tv), somando 11,0% de sítios com substituições (composição nucleotídica média: T=35,5%, C=12,9%, A=28,6% e G=23,0%). Já a matriz de dados do gene COI apresentou 548 SI (71,3%), 56 ts e 31 tv, totalizando 11,3% de sítios com substituições (composição nucleotídica média: T=30,8%, C=24,1%, A=27,2% e G=23,0%). Por fim, o alinhamento do gene H3 consistiu de 301 SI (91,7%), 14 ts e 6 tv, que somaram 6,1% de sítios com substituições (composição nucleotídica média: T=23,6%, C=29,2%, A=22,3% e G=24,9%).

Tabela III (continua): Lotes catalogados em coleções carcinológicas que tiveram ao menos o tecido de um espécime obtido, mas que não houve sucesso na geração de sequências. H: holótipo, T: topótipo, P: parátipo. *espécime juvenil (*Atya* cf. *africana*). CCDB: Coleção de Crustáceos do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; MOUFPE: Coleção Carcinológica do Museu de Oceanografia da Universidade de Pernambuco; DZ-UFRGS: Coleção de Crustáceos do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; DZ-PUC-RS: Departamento de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; MZ-USP: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; MNRJ: Museu Nacional do Rio de Janeiro; CNCR: Colección Nacional de Crustaceos da Universidad Nacional Autónoma de México; MZ-UCR: Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica; NHM: Natural History Museum e RMNH: Naturalis Biodiversity Center.

Coleção/Lote	Espécie	Localidade	Data de coleta
RMNH 45559	<i>Atya africana</i>	Kribi, Camarões	abr/1994
RMNH 50734*		África do Sul	nov/2000
RMNH 34279		Akatayima, Gana	jun/1969
RMNH 103702	<i>Atya brachyrhinus</i>	Barbados	jul/1978
NHM 1972:539 (H)		Barbados	out/1972
CNCR 7840	<i>Atya crassa</i>	Choluteca-Amatillo, Honduras	jan/1977
CNCR 13500		Michoacan, México	jul/1979
RMNH 41822		Valle del Cauca, Colômbia	ago/1983
RMNH 35635		Sinaloa, México	ago/1982
CCDB 2316	<i>Atya gabonensis</i>	Caxias, Maranhão, Brasil	mar/2003
MOUFPE 1820		Alagoas, Brasil	abr/93
MOUFPE 1819		Bacia do Longá, Piauí	jan/1966
RMNH 48639	<i>Atya innocous</i>	Santa Cruz, Curaçao	jun/2000
RMNH 15894	<i>Atya intermedia</i>	Annobón, Guiné Equatorial	1959
RMNH 2338 (H)	<i>Atya lanipes</i>	São Tomás	1898
RMNH 103539		Porto Rico	jul/1980
RMNH 36331 (H)	<i>Atya limnetes</i>	Colômbia	1986
RMNH 16497	<i>Atya margaritacea</i>	Chula, Equador	set/1956
CNCR 5809		Jalisco, México	jun/1986
MZ-UCR-1803		Guatemala	mar/1976
MZ-UCR-1119		Puntarenas, Costa Rica	jan/1967
CNCR 332 (P)	<i>Atya ortmannioides</i>	Michoacán, México	fev/1953
CNCR 1905 (T)		Michoacán, México	mar/1953

Tabela III (conclusão)

Coleção/Lote	Espécie	Localidade	Data de coleta
CNCR 19667	<i>Atya scabra</i>	Guerrero, México	ago/1980
CNCR 625		Oaxaca, México	set/1943
DZ-UFRGS 2192		Rio Grande do Sul, Brasil	mai/1996
DZ-PUCRS 1064		Santa Catarina, Brasil	jun/1985
DZ-PUCRS 1407		Paraná, Brasil	jul/1989
DZ-UFRGS 3187		Rio Grande do Norte, Brasil	jul/2001
MNRJ 2697		Alagoas, Brasil	jan/1986
NHM 1952.9.25.1-5		Veracruz, México	1888
RMNH 50735		Angola/Namíbia	nov/2000
RMNH 20909		Ilha de Santiago, Cabo Verde	fev/1954

Em relação às espécies foco desse trabalho, os dados obtidos no presente estudo, juntamente com as sequências disponíveis no Genbank, permitiram amostrar a maior parte da distribuição geográfica presumida para cada uma das quatro espécies (Tabela I, Figura 2). A distribuição anfi-Atlântica de *A. gabonensis* foi representada por ao menos três localidades da América e três da África. A ocorrência trans-ístmica de *A. innocous* “lato sensu” foi amostrada com ao menos duas localidades de cada vertente da América (Pacífica e Atlântica). A espécie *A. margaritacea* teve a maior parte de sua distribuição amostrada ao longo da costa pacífica da América. Por fim, a espécie mais amplamente distribuída, *A. scabra*, teve sua distribuição quase totalmente amostrada, incluindo desde o Golfo do México (GMx), região do Mar do Caribe (Car), costa atlântica brasileira e africana (Atl), bem como áreas de introdução no Oceano Pacífico.

Além disso, visando inserir a avaliação sistemática em um contexto filogenético, sequências de quatro espécies de *Atya*, 14 outras espécies de atyídeos representando todas as linhagens intra-família reconhecidas, além de um grupo externo de outra família (Xiphocarididae) foram obtidas para as análises (Tabela I).

4.2. Análises filogenéticas

As análises *single locus* (16S, COI e H3) tiveram topologias similares independentemente do método de reconstrução filogenética empregado (ML ou BI), entretanto, houveram pequenas variações nos valores de suporte e em alguns clados terminais. Além disso, as topologias geradas nessas análises foram compatíveis com aquela das análises concatenadas. Tendo em vista a congruência dos resultados, apenas uma topologia (ML ou BI) foi apresentada para cada fragmento de gene e uma para análise concatenada. Ainda assim, a consistência dos ramos recuperados nas topologias apresentadas pode ser avaliada de acordo com os valores de suportes da análise com método de reconstrução filogenética alternativa (plotados nas árvores), bem como com as divergências de topologia, que foram evidenciadas nas figuras (apresentadas abaixo).

Os modelos evolutivos e parâmetros estimados para as análises de BI de cada gene estão sumarizados na Tabela IV. Para os genes 16S e COI, os modelos de substituição TPM3uf e TPM1uf (Posada *et al.*, 2008) foram selecionados, respectivamente, ambos com distribuição gama (+G) e proporção de sítios invariáveis (+I). Tais modelos assumem frequências nucleotídicas e taxas de substituição desiguais (variadas). Já para o gene H3, o modelo de substituição estimado mais provável foi o de K2P, também com distribuição gama (+G) e proporção de sítios invariáveis (+I). Esse modelo assume frequências nucleotídicas e taxas de substituição iguais (Kimura, 1980).

Os testes de saturação (Tabela IV) demonstraram que não existe saturação nas matrizes de dados utilizadas para nenhum gene, visto que os valores de I_{ss} foram maiores, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), do que aquelas de I_{ss} para árvores simétricas (I_{ss.cSym}) e I_{ss} para árvores assimétricas (I_{ss.cAsym}).

Para a topologia do gene 16S (Figura 3) 660 pseudo-réplicas de bootstrap foram calculadas para gerar os valores de suporte da análise de ML. De acordo com esse fragmento de gene o gênero *Atya* não pode ser considerado monofilético, pois *A. ortmannioides* (proveniente do Genbank) está agrupada com outros gêneros da família Atyidae. Entretanto, as demais espécies de *Atya*

incluindo *A. aff. ortmannioides* formaram grupo monofilético com altos valores de suporte. As relações filogenéticas entre as espécies de *Atya* não foram bem resolvidas, com exceção da proximidade de *A. margaritacea* com *A. scabra* e das linhagens de *A. innocous* (apresentado a seguir). Um clado com alto valor de suporte agrupou todos representantes de *A. gabonensis*, porém as sublinhagens dessa espécie apresentaram ramos curtos (pouco divergência) e sem padrão geográfico.

Tabela IV: Modelos de substituição obtidos pelo Bayesian Information Criterion e utilizados nas análises filogenéticas de Inferência Bayesiana e resultados dos testes de saturação de dados. Os parâmetros de frequências nucleotídicas, taxas de substituição, distribuição gamma e proporção de sítios invariáveis também são apresentados. *Para esse modelo de substituição a taxa de transição/traversão é utilizada. **Subconjuntos de amostras. Marcadores moleculares - 16S: Subunidade Ribossomal 16S. COI: Citocromo Oxidase I. H3: Histona H3.

Genes	16S	COI	H3
Modelo de substituição	TPM3uf+I+G	TPM1uf+I+G	K2P+I+G
Distribuição gamma (G)	0.4400	11890	0.8810
Proporção de sítios invariáveis (I)	0.3110	0.5850	0.5810
Frequências nucleotídicas			
Adenina (A)	0.3088	0.3186	0,25
Citosina (C)	0.0995	0.2451	0,25
Guanina (G)	0.2003	0.1296	0,25
Timina (T)	0.3914	0.3068	0,25
Taxas de substituição			
AC	0.3882	1.0000	5.5345*
AG	6.2632	31.2110	
AT	1.0000	4.8528	
CG	0.3882	4.8528	
CT	6.2632	31.2110	
GT	1.0000	10.000	
Teste de saturação 4/8/16/32**			
Iss	0,266/0,283/0,303/0,339	0,376/0,406/0,390/0,372	0,100/0,097/0,093/0,097
Iss.cSym	0,798/0,755/0,726/0,706	0,811/0,774/0,755/0,729	0,783/0,736/0,685/0,684
Iss.cAsym	0,765/0,643/0,516/0,379*	0,779/0,665/0,549/0,409	0,755/0,627/0,478/0,355

Em relação a *A. innocous* duas linhagens foram recuperadas, sendo que a primeira agrupou os representantes de *A. innocous* da vertente atlântica da América (Mar do Caribe), que desse ponto em diante será referida como *A. innocous* “stricto sensu”. A segunda linhagem agrupou amostras de *A. innocous* da vertente do Pacífico das Américas, a partir de agora chamada de *A. tenella* (as duas linhagens em conjunto serão denominadas *A. innocous* “lato sensu”). Os valores de suporte agrupando *A. innocous* “lato sensu” foram baixos. Por sua vez, altos valores de suporte sustentam um clado formado por *A. margaritacea* + *A. scabra*. Uma amostra de *A. scabra* (México) está como grupo irmão de um clado (com baixo valor de bootstrap e não recuperado na BI) composto pelas demais *A. scabra* e todas *A. margaritacea*. As sequências de *A. margaritacea* geradas no presente estudo foram agrupadas com alto valor de suporte, enquanto a amostra obtida no Genbank está mais relacionada com *A. scabra*.

Valores de suporte da análise de ML do gene COI foram estabelecidos por 708 pseudo-réplicas de bootstrap. Na topologia desse gene (Figura 4) o gênero *Atya* aparece como monofilético, porém, os valores de suporte calculados que agrupam *A. gabonensis* com as demais espécies do gênero são baixos. Além disso, não há sequências de *A. ortmannioides* (Genbank) disponíveis para esse gene. Ainda assim, *A. aff. ortmannioides* foi agrupada dentro do clado com a maioria espécies de *Atya*, como grupo irmão de *A. tenella*, mas sem suporte. Exceto para o clado *A. margaritacea* + *A. scabra*, as relações entre as espécies de *Atya* não estão bem estabelecidas (valores de suporte baixos).

A espécie *A. gabonensis* formou um clado com altos valores de suporte, dividido em duas linhagens, a primeira com representantes da distribuição africana da espécie e a segunda com os da América do Sul. Embora o clado americano seja altamente suportado pela ML e BI, o clado africano não foi recuperado com congruência entre as metodologias filogenéticas. *A. innocous* “lato sensu” não formou um grupo monofilético e as linhagens *A. tenella* e *A. innocous* “stricto sensu” tiveram valores de suporte altos. As sequências de *A. margaritacea* geradas nesse trabalho formaram um grupo monofilético com alto valor de suporte, contudo a sequência obtida do Genbank está relacionada aquelas de *A. scabra*. O clado formado por todas amostras de *A. scabra* não teve

suporte alto, entretanto duas linhagens aparecem altamente suportadas, *A. scabra* “linhagem GMx” (proveniente do Golfo do México) e *A. scabra* “linhagem Atl+Car” (proveniente do Atlântico e do Mar do Caribe). Na segunda linhagem, três clados com valores de suporte altos e significado geográfico, mas com ramos curtos, foram recuperados: África, Brasil e Mar do Caribe, este último incluindo a sequência de *A. margaritacea* proveniente do Genbank.

Um total de 1008 pseudo-réplicas de bootstrap estimaram os valores de suporte da análise de ML do gene H3. Na topologia desse marcador (Figura 5) o gênero *Atya* não pode ser considerado monofilético, uma vez que *A. ortmannioides* (proveniente do Genbank) está mais relacionada a outros gêneros de Atyidae. Com exceção dessa sequência, *Atya* forma um grupo monofilético com altos valores de suporte incluindo *A. aff. ortmannioides*.

Dentro do gênero as linhagens apresentaram politomias ou tiveram suporte baixo com exceção de *A. gabonensis* e *A. lanipes*. As sequências de *A. ortmannioides* geradas no presente estudo estão relacionadas com *A. tenella* incluindo *A. aff. ortmannioides*, embora o suporte não seja alto. Amostras de *A. innocous* “stricto sensu” não foram obtidas para esse marcador. Uma sequência de *A. scabra* (Jamaica) foi agrupada em um clado com baixo suporte formado por *A. intermedia* + *A. lanipes* + *A. gabonensis*. As demais amostras de *A. scabra* estão agrupadas e proximamente relacionadas com *A. margaritacea* (proveniente do Genbank) e do clado com alto valor de bootstrap (mas não probabilidades posteriores) formado pelas *A. margaritacea* aqui amostradas.

Na análise concatenada de ML os suportes foram determinados por 504 pseudo-réplicas de bootstrap. Na topologia dos genes concatenados (Figura 6A) o posicionamento de *A. ortmannioides* (proveniente do Genbank) relacionado mais proximamente com outros gêneros da família Atyidae evidencia o gênero *Atya* como não monofilético. Com exceção dessa sequência, as demais amostragens de espécies do gênero formam um grupo com valores de suporte altos, incluindo as sequências de *A. ortmannioides* e de *A. aff. ortmannioides* obtidas no presente estudo. Os clados formados entre as espécies de *Atya* não apresentaram suporte, apenas o clado agrupando *A. margaritacea* + *A. scabra* (não recuperado na análise de ML).

A. gabonensis formou uma linhagem monofilética com um clado interno agrupando espécimes americanos, ambos bem suportados. Porém, os representantes da África apresentaram um padrão de ramificação em politomia. Duas linhagens independentes, correspondentes a *A. innocous* “lato sensu”, formaram grupo irmão sem suporte, uma corresponde a *A. innocous* “stricto sensu” e a outro a *A. tenella*. As sequências de *A. ortmannioides* geradas nesse estudo (apenas gene H3) não tiveram relação filogenéticas bem suportadas e não foram agrupadas entre elas. Embora as duas linhagens de *A. scabra* (GMx e Atl+Car) formem grupo irmão na topologia apresentada, um agrupamento monofilético destas duas linhagens não foi observado na análise de ML, tampouco apresentou valor de probabilidade posterior alto na BI.

Figura 3: Filograma obtido por análise de Maximum Likelihood (ML) com o fragmento do gene mitocondrial subunidade ribossomal 16S. Os números próximos aos nós indicam valores de 660 pseudo-réplicas de bootstrap e a probabilidade posterior da Bayesian inference (BI). Apenas valores de bootstrap acima de 50 e de probabilidades posteriores maiores que 0,90 são mostrados. Hifens "-" indicam nós recuperados em ambas as análises filogenéticas (ML e BI), mas com valores de suporte inferiores aos citados. Asteriscos "*" indicam nós não recuperados por uma das análises (incongruências). Nós com valores de suporte altos (acima de 70/0,95) estão marcados com círculos cinzas, nós completamente suportados (100/1) são marcados com círculos pretos. Interrogações "?" indicam sequências retiradas do Genbank, não identificadas morfologicamente, cujas identificações são questionadas (ver discussão). A barra (escala) indica 2 substituições a cada 100 pares de base. O padrão de cores das espécies foco do estudo segue o da Figura 2 e demais filogramas. Af: África, Am: América, Atl: Atlântico, Pac: Pacífico, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo, SE: Sergipe.

Figura 4: Filograma obtido por análise de Maximum Likelihood (ML) com o fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I. Os números próximos aos nós indicam valores de 708 pseudo-réplicas bootstrap e a probabilidade posterior da Bayesian inference (BI). Apenas valores de bootstrap acima de 50 e de probabilidades posteriores maiores que 0,90 são mostrados. Hífens “-” indicam nós recuperados em ambas as análises filogenéticas (ML e BI), mas com valores de suporte inferiores aos citados. Asteriscos “*” indicam nós não recuperados por uma das análises (incongruências). Nós com valores de suporte altos (acima de 70/0,95) estão marcados com círculos cinzas, Nós completamente suportados (100/1) são marcados com círculos pretos. Interrogações “?” indicam sequências retiradas do Genbank, não identificadas morfológicamente, cujas identificações são questionadas (ver discussão). A barra (escala) indica 6 substituições a cada 100 pares de base. O padrão de cores das espécies foco do estudo segue o da Figura 2 e demais filogramas. Af: África, Am: América, Atl: Atlântico, Car: Caribe, GMx: Golfo do México, Pac: Pacífico, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo, SE: Sergipe.

Figura 5: Filograma obtido por análise de Maximum Likelihood (ML) com o fragmento do gene nuclear Histona 3. Os números próximos aos nós indicam valores de 1008 pseudo-réplicas de bootstrap e a probabilidade posterior da Bayesian inference (BI). Apenas valores de bootstrap acima de 50 e de probabilidades posteriores maiores que 0,90 são mostrados. Hifens “-” indicam nós recuperados em ambas as análises filogenéticas (ML e BI), mas com valores de suporte inferiores aos citados. Asteriscos “*” indicam nós não recuperados por uma das análises (incongruências). Nós com valores de suporte altos (acima de 70/0,95) estão marcados com círculos cinzas, nós completamente suportados (100/1) são marcados com círculos pretos. Interrogações “?” indicam sequências retiradas do Genbank, não identificadas morfológicamente, cujas identificações são questionadas (ver discussão). A barra (escala) indica 3 substituições a cada 100 pares de base. O padrão de cores das espécies foco do estudo segue o da Figura 2 e demais filogramas. Af: África, Am: América, Atl: Atlântico, Pac: Pacífico, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo, SE: Sergipe.

A)

Subunidade Ribossomal 16S
Citocromo Oxidase I
Histona H3

B)

Figura 6 (página anterior): A) Filograma obtido por análise de Bayesian inference (BI) com os genes concatenados (mtDNA 16S e COI + nDNA H3). Os números próximos aos nós indicam valores de probabilidades posteriores e de 504 pseudo-réplicas de bootstrap na análise de Maximum Likelihood (ML). Apenas valores de probabilidades posteriores maiores que 0,90 e de bootstraps acima de 50 são mostrados. Hifens “-” indicam nós recuperados em ambas as análises filogenéticas (ML e BI), mas com valores de suporte inferiores aos citados. Asteriscos “*” indicam nós não recuperados por uma das análises (incongruências). Nós com valores de suporte altos (acima de 70/0,95) estão marcados com círculos cinzas, nós completamente suportados (100/1) são marcados com círculos pretos. Interrogações “?” indicam sequências retiradas do Genbank, não identificadas morfológicamente, cujas identificações são questionadas (ver discussão). Cerquilhas “#” indicam OTU's com sequências combinadas de espécimes/localidades/espécies diferentes combinadas, (ver material e métodos). Os retângulos coloridos indicam disponibilidade do gene correspondente para aquela OTU, retângulos em branco indicam indisponibilidade (*missing data*). A barra (escala) indica 3 substituições a cada 100 pares de base. B) Distribuição geográfica das linhagens e hipóteses secundárias de espécies (HSEs) identificadas nesse estudo. Af: África, Am: América, Atl: Atlântico, Car: Caribe, GMx: Golfo do México, Pac: Pacífico, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo, SE: Sergipe.

4.3. Análises de distância genética

Apesar de não haver divergência clara de linhagens da espécie *A. gabonensis* (América do Sul vs. África), nas matrizes de distância essa espécie foi separada por origem geográfica das amostras, com intuito de apresentar a divergência/similaridade genética entre essas regiões. Além disso, a sequência de 16S obtida do Genbank dessa espécie (EF489989) não fez parte da construção da matriz, uma vez que sua origem geográfica é incerta (Tabela I).

De acordo com a busca de modelo de substituição mais adequado para cada gene, foi selecionado para a construção da matriz de distância dos três genes o modelo de Tamura-Nei (TrN) (Tamura & Nei, 1993), que assume frequências de bases variáveis (desiguais), taxas de substituição distintas entre nucleotídeos e diferencia transições e transversões.

Para o gene 16S (Tabela V), dos 533 pb totais do alinhamento 481 pb (sítios) foram incluídos na análise (95% *partial deletion*). As divergências intraespecíficas (HPEs) variaram de 0,0 a 3,2%, porém, quando consideradas as linhagens encontradas nas análises filogenéticas e as HSEs, as divergências variaram de 0,0 a 0,6%. Essa diferença é devida as duas linhagens encontradas para *A. innocous* “lato sensu” (*A. innocous* “stricto sensu” e *A. tenella*), que divergiram de 1,9 a 2,6% entre elas. A distância genética encontrada entre as amostras de *A. scabra* “linhagem GMx” comparada à “linhagem Atl+Car” (0,0 a 0,6%) é igual a encontrada dentro de uma só linhagem (*A. innocous* “stricto sensu” de 0,6%).

Comparando-se as espécies *A. scabra* e *A. margaritacea* (apenas os espécimes obtidos nesse estudo) a divergência foi de 0,8 a 1,1%, levemente acima da máxima intra-linhagem. Porém, a sequência de *A. margaritacea* (proveniente do Genbank) variou de 0,0 a 0,4% quando comparada às de *A. scabra*, e de 0,8 a 1,1%, em relação às de *A. margaritacea* aqui amostradas. Não houve variação (0,0%) entre os espécimes de *A. gabonensis* com origem na África com os da América do Sul. Já as distâncias genéticas interespecíficas (intra-gênero *Atya*) calculadas foram de 0,8 a 9,3%. Se considerada *A. ortmannioides* (Genbank) (filogeneticamente posicionada fora da linhagem com todas as demais *Atya*), a divergência interespecífica (intra-gênero *Atya*) é maior,

entre 11,7 e 13,5%. Por fim, as divergências entre *Atya* [*A. ortmannioides* (Genbank) excluída] e os demais gêneros da família Atyidae e *outgroup* foram de 13,4 a 29,8%.

Para o gene COI (Tabela VI), os 768 pb do alinhamento foram utilizados na análise (95% *partial deletion*). As distâncias genéticas intraespecíficas (HPEs) foram de 0,0 a 14,0%, ao passo que a divergência dentro das linhagens variou entre 0,0 e 2,8%. A variação entre as linhagens de *A. scabra* (“linhagem GMx” e “linhagem Atl+Car”) foi de 6,9 a 8,3%, e entre as duas linhagens de *A. innocous* “lato sensu” ficou de 12,6 a 12,9%. A divergência máxima encontrada entre as linhagens de *A. gabonensis* (África e América do Sul) foi de 2,3%, abaixo daquela encontrada dentro de uma mesma linhagem, *A. scabra* “linhagem Atl+Car”, de 2,8%. Por sua vez, as distâncias genéticas interespecíficas (intra-gênero *Atya*) variaram de 7,6% a 20,5%. Finalmente, as divergências calculadas para os demais táxons (outros gêneros e *outgroup*), quando comparados à *Atya*, variou de 16,5% a 24,5%.

Ao todo 308 pb foram utilizados na análise do gene H3 (Tabela VII), portanto 20 sítios foram eliminados previamente à análise (95% *partial deletion*). Devido a baixa resolução (pouca variação genética) desse marcador para o nível específico encontrada para camarões atyídeos nesse estudo, as divergências intraespecíficas (HPEs) ficaram entre 0,0 a 0,3%, igual àquela encontrada entre linhagens e mesmo indivíduos em alguns casos. As distâncias genéticas interespecíficas (intra-gênero *Atya*) variaram de 0,0 a 1,3%, excluindo *A. ortmannioides* (Genbank, não agrupada filogeneticamente com o restante do gênero), e 0,0 a 5,9% incluindo essa sequência. Para os demais atyídeos comparado ao gênero *Atya* [*A. ortmannioides* (Genbank) excluída] a divergência foi entre 5,5 a 16,1%.

Tabela V: Matriz de distância genética (TrN) do fragmento do gene mitocondrial subunidade ribossomal 16S, calculado com 95% de *Partial Deletion*. Os valores estão em porcentagem (%). Dados dos espécimes estão descritos na tabela I. N: número de espécimes utilizados. ?: Sequências obtidas no Genbank cuja identificação morfológica não foi realizada (ver discussão).

Espécimes	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1) <i>A. scabra</i> "linhagem Atl+Car"	9	0,0-0,4														
2) <i>A. scabra</i> "linhagem GMx"	2	0,0-0,6	0,4													
3) <i>A. margaritacea</i> ?	3	0,0-0,2	0,0-0,4	-												
4) <i>A. margaritacea</i>	1	0,8-1,3	0,8-1,1	0,8-1,1	0,0-0,2											
5) <i>A. innocous</i> "stricto sensu"	2	4,8-5,3	4,3-5,0	4,8-5,0	4,1-4,6	0,6										
6) <i>A. tenella</i>	2	4,8-5,1	4,3-4,8	4,8	4,1-4,3	1,9-2,6	0,0									
7) <i>Atya</i> aff. <i>ortmannioides</i>	1	5,5-5,8	5,0-5,5	5,5	5,3-5,5	2,6-3,2	2,4	-								
8) <i>A. gabonensis</i> (América)	3	7,1-7,3	6,6-7,1	7,1	7,1-7,4	6,4-6,6	6,2	5,9	0,0							
9) <i>A. gabonensis</i> (África)	3	7,1-7,3	6,6-7,1	7,1	7,1-7,4	6,4-6,6	6,2	5,9	0,0	0,0						
10) <i>A. lanipes</i>	1	3,9-4,1	3,9	3,9	3,7-3,9	4,3-4,8	4,6	4,1	6,9	6,9	-					
11) <i>A. dressleri</i>	1	6,9-7,2	6,5-6,9	6,9	6,9-7,2	8,1-8,3	7,9	7,1	9,3	9,3	7,4	-				
12) <i>A. ortmannioides</i> ?	1	11,8-11,9	11,7-11,9	11,9	11,9-12,2	12,0	12,3	12,6	12,8	12,8	12,0	13,5	-			
13) " <i>Atya</i> group"	6	14,9-18,5	14,8-18,5	15,0-18,5	15,0-18,2	13,4-18,2	14,2-17,9	15,1-19,6	15,6-19,0	15,6-19,0	15,1-18,8	15,0-20,1	11,0-14,9	10,5-20,3		
14) Outros <i>Atyidae</i>	7	18,3-27,6	18,3-27,4	18,3-27,4	18,3-27,1	16,7-26,8	18,7-28,4	18,6-29,5	19,2-28,9	19,2-28,9	18,9-29,4	19,8-29,8	16,6-27,4	14,9-31,5	8,5-31,1	
15) <i>Xiphocaris elongata</i>	1	26,8-27,3	27,1	27,1	26,2-26,5	26,3-26,6	27,3	27,6	29,8	29,8	26,8	26,7	23,9	25,8-36,9	25,8-36,9	-

Tabela VI: Matriz de distância genética (TrN) do fragmento do gene nuclear Citocromo Oxidase I, calculado com 95% de *Partial Deletion*. Os valores estão em porcentagem (%). Dados dos espécimes estão descritos na tabela I. N: número de espécimes utilizados.

Espécimes	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1) <i>A. scabra</i> "linhagem Atl+Car"	8	0,1-2,8											
2) <i>A. scabra</i> "linhagem GMx"	2	6,9-8,3	1,3										
3) <i>A. margaritacea</i>	4	7,7-8,7	7,6-7,9	0,3-0,7									
4) <i>A. innocous</i> "stricto sensu"	2	13,9-15,2	19,9-14,2	14,4-15,1	0,7								
5) <i>A. tenella</i>	3	15,6-16,8	15,5-15,9	14,4-15,4	12,6-12,9	0,1-0,5							
6) <i>Atya</i> aff. <i>ortmannioides</i>	1	16,5-17,4	14,9	15,6-15,9	13,8-14,0	13,6-13,9	-						
7) <i>A. gabonensis</i> (América)	3	19,0-20,5	19,3-19,5	19,2-19,4	17,3-17,7	18,5-19,1	17,8-18,0	0,0-0,4					
8) <i>A. gabonensis</i> (África)	2	19,0-20,4	19,6-20,5	18,5-18,7	17,4-18,0	17,8-18,2	17,6-17,7	2,1-2,3	0,8				
9) <i>A. lanipes</i>	2	15,7-17,3	15,0-15,4	16,3-16,9	15,4-15,7	14,8-15,2	14,7-14,9	15,8-16,2	15,7-16,3	0,1			
10) <i>A. intermedia</i>	1	13,7-14,9	14,8-15,3	13,7-14,0	12,0-12,2	11,5-11,8	13,0	19,8	18,4	14,1-14,3	-		
11) " <i>Atya</i> group"	1	19,2-20,1	18,9-19,1	19,4-19,9	18,6-18,8	19,4-19,8	17,4	16,7-16,9	16,5-16,7	19,4-19,6	18,8	-	
12) <i>Xiphocaris elongata</i>	1	22,7-24,5	22,7-23,4	23,0-23,4	21,9-22,0	22,8-23,0	24,0	21,1-21,7	21,5-22,1	23,4-23,6	20,8	24,3	-

Tabela VII: Matriz de distância genética (TrN) do fragmento do gene nuclear Histona 3, calculado com 95% de *Partial Deletion*. Os valores estão em porcentagem (%). Dados dos espécimes estão descritos na tabela I. N: número de espécimes utilizados.?: Sequências obtidas no Genbank cuja identificação morfológica não foi realizada (ver discussão).

Espécimes	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1) <i>A. scabra</i> "linhagem Atl+Car"	8	0,0-0,3														
2) <i>A. scabra</i> "linhagem GMx"	2	0,0-0,3	0,0													
3) <i>A. margaritacea</i> ?	1	0,0-0,3	0,0	-												
4) <i>A. margaritacea</i>	3	0,0-0,3	0,0	0,0	0,0											
5) <i>A. tenella</i>	2	0,3-0,7	0,7	0,7	0,3-0,7	0,0										
6) <i>Atya</i> aff. <i>ortmannioides</i>	1	0,3-0,7	0,7	0,7	0,3-0,7	0,0	-									
7) <i>A. gabonensis</i> (América)	3	0,3-0,7	0,7	0,7	0,0-0,7	0,7	0,7	0,0								
8) <i>A. gabonensis</i> (África)	3	0,3-0,7	0,7	0,7	0,0-0,7	0,7	0,7	0,0	0,0							
9) <i>A. lanipes</i>	2	1,0-1,3	1,3	1,3	0,3-1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	0,0						
10) <i>A. intermedia</i>	1	0,0-0,3	0,3	0,3	0,0-0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	1,0	-					
11) <i>A. ortmannioides</i>	2	0,0-0,7	0,3-0,7	0,3-0,7	0,0-0,7	0,0	0,0	0,3-0,7	0,3-0,7	1,0-1,3	0,0-0,3	0,0				
12) <i>A. ortmannioides</i> ?	1	5,5-5,9	5,9	5,9	5,6-5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,5	5,5-5,9	-			
13) " <i>Atya</i> group"	6	5,5-8,1	5,8-8,0	5,8-8,0	5,5-8,0	5,8-7,7	5,8-7,7	5,8-8,5	5,8-8,5	5,8-8,5	5,5-8,1	5,5-7,7	3,5-6,8	3,8-8,1		
14) Outros <i>Atyidae</i>	7	7,7-16,0	7,7-16,0	7,7-16,0	7,5-16,0	8,5-16,1	8,5-16,1	8,5-16,0	8,5-16,0	7,7-15,2	8,1-15,6	8,2-16,1	4,9-13,4	3,9-15,2	0,7-1,4	
15) <i>Xiphocaris elongata</i>	1	9,9-10,3	9,9	9,9	9,9-10,0	10,3	10,3	10,7	10,7	10,7	10,3	9,6	8,5	5,5-9,3	5,7-11,2	-

4.4. ABGD, PTP e GMYC

A matriz final das análises de delimitação de espécies conteve 28 sequências com 100% de sobreposição (768 pb) do gene COI. Os resultados das três análises realizadas (ABGD, PTP e GMYC) encontram-se sintetizados na Figura 7. Entre as quatro entidades foco do estudo, duas (35%) corresponderam às HPEs (*A. margaritacea* e *A. gabonensis*), sendo que *A. innocous* “lato sensu” foi subdividida em duas potenciais espécies (*A. innocous* “stricto sensu” e *A. tenella*) e *A. scabra* em duas (*A. scabra* “linhagem GMx” e *A. scabra* “linhagem Atl+Car”).

A análise de ABGD (Figura 8) identificou um *barcode gap* entre 3 e 7% (Figura 8-B e C), e apesar de o limiar inicial médio para crustáceos decápodes de 2% delimitar 10 espécies, os maiores limiares, da análise recursiva (1-12,9%), identificaram apenas nove espécies no conjunto de dados (Figura 8-A). A partir do limiar de 21,5%, na análise recursiva, o número de espécies identificadas é reduzido até atingir o valor de 35,9%, no qual não é possível mais identificar espécies nos dados.

Considerando o *barcode gap* específico de camarões atyídeos entre 3,8 a 6,9% (K2P) (Silva *et al.*, 2011), a distância genética interespecífica (intragênero *Atya*) de 8,2% a 24,6% calculada nesse estudo, o *barcode gap* identificado nessa análise (3 a 7%) e a diversidade genética conhecida para *A. scabra* de até 2,8% dentro de uma mesma população (deme) (Oliveira *et al.*, submetido), os resultados da análise recursiva (limiares maiores) foram considerados mais prováveis. Dessa forma, o método ABGD de delimitação molecular de espécies identificou a existência de nove possíveis espécies (entidades), duas em *singletons* e sete em *clusters* (Figura 8-A).

De acordo com a análise de PTP (Figura 9) o número de espécies contidos no conjunto de dados foi entre 9 e 17 (média de 10,45), porém apenas 9 dessas apresentou valores de suporte de ML maiores de 50%. Com exceção do *cluster A. scabra* (com 55%), todas as demais entidades (*singletons* e *clusters*) evidenciados apresentaram valores de suporte altos (i.e. >70%). Portanto, o PTP delimitou as mesmas potenciais espécies evidenciadas pelo ABGD citadas.

Finalmente, na análise de GMYC (Figura 10) o modelo de uma filogenia com várias espécies e um momento único de coalescência (modelo GMYC de limiar único) teve probabilidade de 11,46, significativamente ($p = 0,000$) superior ao modelo de uma filogenia formada por uma única espécie contendo apenas processos coalescentes (modelo nulo) com 4,52 de probabilidade. Ou seja, a plotagem de uma linhagem por tempo realizada na árvore ultramétrica apresentou um aumento repentino na taxa de processos de ramificação (aumento das dicotomias) que é atribuído à mudança de ramificações interespecíficas para intraespecíficas estatisticamente significativa. O que é corroborado pelo intervalo dessas mudanças na árvore (Figura 10-A) corresponder ao intervalo de aumento das probabilidades estimadas (Figura 10-C) e aumento das ramificações (Figura 10-B).

Dessa forma, a identificação desse momento de transição de especiação para coalescência no método de GMYC resultou em uma partição com nove entidades, seis a 12 no intervalo de confiança (95%). As linhagens representadas por tais entidades tiveram suporte probabilístico alto e correspondem às mesmas citadas anteriormente que foram encontradas nas demais análises (Figura 8-A). Apenas os ramos da árvore correspondentes aos *clusters* *A. scabra* “linhagem GMx” e *A. scabra* “linhagem Atl+Car” não foram bem suportados.

Figura 7: Resultados das análises de delimitação molecular de espécies realizadas com o fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I: Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Poisson Tree Processes (PTP) e Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC). A topologia de Maximum Likelihood (ML) do gênero *Atya* baseada no gene mitocondrial Citocromo Oxidase I teve os grupos externos removidos. Nós com valores de suporte de bootstrap e probabilidade posterior (BI) altos (acima de 70/0,95) estão marcados com estrelas cinzas, nós completamente suportados (100/1) com estrelas pretas. Retângulos cinzas representam as hipóteses primárias de espécies (HPEs) conforme reconhecidas morfologicamente por Hobbs & Hart (1982) e De Grave & Fransen (2011). Barras verticais pretas indicam *singletons* e *clusters* sugeridos como potenciais espécies (HSEs). Ilustrações das espécies modificadas de Hobbs & Hart (1982, pags. 24 e 25).

Figura 8: Resultados da análise de Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) utilizando o fragmento do gene Citocromo Oxidase I. A) *Clusters* e *singletons* delimitados com as partições iniciais e recursivas. A partição em 9 grupos (em cinza) é considerada mais provável (ver resultados). B) Histogramas de distância genética (K2P). C) Representação gráfica das distâncias ordenadas (Ranked). Cerquilha “#” indica valores de distância correspondente ao *barcode gap*.

Figura 9: Resultado da análise de Poisson Tree Processes (PTP) utilizando o fragmento do gene Citocromo Oxidase I. Topologia indicando os *singletons* e *clusters* representando prováveis espécies (em rosa). Valores de suporte (adjacentes aos nós) altos (mais próximos de 100) indicam a probabilidade dos descendentes daquele nó serem de uma espécie.

Figura 10: Resultados da análise Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC). Topologia da árvore ultramétrica com base no fragmento do gene Citocromo Oxidase I. Números próximos aos ramos indicam valores de probabilidade. B) Representação gráfica do número de linhagens por tempo. C) Perfil da probabilidade pelo tempo. As linhas verticais vermelhas representam o limiar inferido entre ramificações correspondentes à eventos de especiação (interespecíficos) e eventos coalescentes (intraespecíficos).

5. DISCUSSÃO

5.1. Delimitação molecular de espécies

Uma vez que hipóteses de espécies baseadas em mais de um fonte de dados são consideradas mais criteriosas e consistentes (Hillis, 1987; Hołyński, 2010; Carstens *et al.*, 2013) o presente estudo buscou complementar a minuciosa revisão taxonômica realizada por Hobbs & Hart (1982) com dados moleculares, avaliando as hipóteses específicas já questionadas e discutindo quaisquer corroborações ou incongruências encontradas a luz de informações morfológicas, moleculares e biogeográficas, visando somar evidências que sustentem as propostas aqui realizadas (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005).

Contudo, a delimitação de espécies com dados moleculares não é uma tarefa trivial (Lefébure *et al.*, 2006; Page & Hughes, 2011; Carstens *et al.*, 2013; Weiss *et al.*, 2015) e, por isso, o presente estudo buscou se fundamentar em um conjunto de metodologias de maneira complementar para essa finalidade, como similaridade nucleotídica e compartilhamento de caracteres de dois marcadores moleculares mitocondriais (16S e COI) e um nuclear (H3), bem como três diferentes análises próprias para delimitação de espécies realizadas com o gene COI (ABGD, PTP e GMYC).

Em relação às análises de distância genética, a quantificação de *barcode gaps* é considerada eficaz e tem sido amplamente utilizada com crustáceos decápodes (revisado por Costa *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011 e Raupach & Radulovici, 2015). Contudo, o intervalo entre distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas além de poder não existir em espécies recém-originadas (Avise, 2000), pode também variar bastante entre grupos mesmo que dentro de uma ordem como Decapoda (Silva *et al.*, 2011), não sendo possível estabelecer parâmetros únicos como um *barcode gap* universal (DeSalle *et al.*, 2005; Waugh, 2007).

Dessa forma, as avaliações realizadas no presente estudo se basearam principalmente nas divergências aqui calculadas (TrN) para o gênero *Atya* (16S; COI; H3; em %: intraespecífica = 0,0-0,6; 0,0-2,8; 0,0-0,3; interespecífica = 0,8-9,3; 7,6-20,5; 0,0-1,3) e da família *Atyidae* revisada por Silva *et al.* (2011) (K2P)

(COI; em %: intraespecífica $\cong$ 0,7-0,8; interespecífica $\cong$ 13,0-14,0). Vale a observação que a interpretação de valores de distância genética em si pode ser subjetiva e permitir diferentes interpretações de um mesmo resultado (Weiss *et al.*, 2015).

Por sua vez, as análises filogenéticas com três fragmentos de genes concatenados foram realizadas visto a importância de verificar linhagens correspondentes ou não às hipóteses taxonômicas das espécies em um contexto evolutivo (DeSalle *et al.*, 2005; Schubart, 2011; Bracken-Grissom *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2016). Com isso, tentou-se recuperar a história evolutiva das espécies e não a de seus genes (*gene trees*) (Moore, 1995; Nichols, 2001; Palero & Crandall, 2009; Timm & Bracken-Grissom, 2015).

Entretanto, os genes 16S e COI apresentaram divergência genéticas mais adequadas para avaliação do nível específico das espécies de *Atya*, resolução relacionada à maior taxa de mutação do mDNA (Moritz *et al.*, 1987; Schubart *et al.*, 2000). Já o gene H3 nDNA, para o gênero *Atya* apresentou divergência intraespecífica e interespecífica com sobreposição, o que se refletiu em baixa resolução da árvore desse gene para delimitar espécies. Taxas evolutivas inadequadas para resolução de divergência em nível específico com esse marcador já foi observado também para outros gêneros de crustáceos decápodes (Olguín & Mantelatto, 2013; Rossi & Mantelatto, 2013). Assim, as linhagens em nível específico foram resolvidas majoritariamente com bases nos marcadores mitocondriais.

Além de análises filogenéticas e de distância, análises próprias para delimitação de espécies com dados moleculares foram utilizadas. A análise de ABGD consiste em uma maneira automatizada de agrupamentos de sequências com menor distância genética (similaridade nucleotídicas) entre elas (Puillandre, 2012), ao passo que as análises de PTP e GMYC utilizam árvores filogenéticas e coalescência para distinguir eventos cladogenéticos populacionais (intraespecíficos) daqueles de especiação (interespecíficos) (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014). A primeira utilizando substituições nas sequências (Zhang *et al.*, 2013) e a segunda, tempo

de divergência baseados em uma árvore calibrada (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013).

Importante ressaltar que as análises de ABGD, PTP e GMYC foram realizadas apenas para o marcador molecular COI, que teve melhor resolução populacional/específica observada no presente estudo. Contudo, análises de delimitação de espécies *single-locus* podem levar a um número de potenciais espécies em uma matriz de dados equivocado (Talavera *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014), bem como refletem a história de um marcador apenas (Fujita *et al.*, 2012; Carstens *et al.*, 2013). Portanto, HSEs das análises próprias para delimitação de espécies devem ser analisadas em um contexto conjunto com as demais análises aqui realizadas com outros marcadores moleculares, bem como serem avaliadas levando-se em consideração outras evidências, como caracteres morfológicos e informações biogeográficas (Carstens *et al.*, 2013).

Apesar da importância de se obter dados genéticos dos espécimes da série tipo para avaliação sistemática (Dayrat, 2005; Bracken-Grissom *et al.*, 2014), no presente estudo nenhuma sequência de material tipo foi obtida apesar das tentativas realizadas. O uso de formaldeído para a preservação de espécimes é conhecido por dificultar ou inviabilizar a obtenção de sequências de DNA, uma vez que essa substância pode causar fragmentação e desnaturação do DNA, bem como interferir nos processos de isolamento, amplificação e sequenciamento do mesmo (Schander & Halanynch, 2003; Bucklin & Allen, 2004; Palero *et al.*, 2010; Aznar-Cormano *et al.*, 2015).

Por fim, estudos que gerem novas sequências ainda não amostrados em bancos de dados quanto a espécies, regiões geográficas ou marcadores moleculares tem a relevância de contribuir com o fornecimento de dados os quais poderão ser incorporados a futuros trabalhos sistemáticos mais abrangentes (e.g Bracken *et al.*, 2009; von Rintelen *et al.*, 2012) ou constar para futuras comparações em trabalhos de taxonomia integrativa (Cook L.J. *et al.*, 2010). Nesse sentido, sequências inéditas para as espécies *A. dressleri* e *A. intermedia* foram geradas, bem como amostragem geográfica e de marcadores para as outras seis espécies do gênero foram expandidas (Tabela I).

5.2. Sistemática do gênero *Atya*

5.2.1. A questão *A. gabonensis* (América/África)

A possibilidade de uma espécie apresentar distribuição anfi-atlântica comumente intriga pesquisadores (Nunes *et al.*, 2011; Schubart, 2011; Almada *et al.*, 2016), principalmente quando tais espécies apresentam a maior parte do seu ciclo de vida confinadas a ambientes dulcícolas (Murphy & Austin, 2005; Page *et al.*, 2008; Oliveira, 2014; Oliveira *et al.* submetido). Esse é o caso de *A. gabonensis* uma espécie presumidamente anfídroma (Hobbs & Hart, 1982; Bauer, 2013) cuja hipótese taxonômica atual sugere sua distribuição geográfica ao longo das costas atlânticas da África e América (Hobbs & Hart, 1982).

As análises realizadas sustentaram a hipótese taxonômica de *A. gabonensis* como uma espécie de distribuição anfi-Atlântica, corroborando a proposta de Ortmann (1895) de *Euatya sculptilis* como sinônimo júnior de *A. gabonensis*, também aceita na revisão taxonômica de Hobbs & Hart (1982). Apenas o marcador mais variável, COI, apresentou divergência entre espécimes da África com aqueles da América do Sul, contudo a divergência intraespecífica encontrada (2,3%) é inferior àquela interespecífica aqui quantificada para o gênero e revisada para a família Atyidae (Silva *et al.*, 2011).

Além disso, nenhuma das análises de delimitação de espécies subdividiu *A. gabonensis* em mais de uma potencial espécie, tampouco a divergência notada nas análises filogenéticas evidenciam eventos de especiação dentro do clado formado pelos espécimes amostrados dos dois lados do Atlântico. Além do clado de espécimes da América do Sul evidenciado nas análises filogenéticas do marcador COI e com dados concatenados, que possivelmente indica apenas estruturação populacional, não há evidências que sustentem duas espécies sob mesmo nome.

Historicamente a distribuição geográfica anfi-atlântica de *A. gabonensis* foi atribuída à abertura do oceano Atlântico e consequente separação dos continentes africano e americano há 66 milhões de anos (Hobbs & Hart, 1982; Torsvik *et al.*, 2009), visto que a dispersão de larvas de *Atya* mesmo entre ilhas próximas no mar do Caribe foi considerada improvável (Hart, 1961; Fryer, 1977).

Diante desse cenário biogeográfico, milhares de anos de alopatria possivelmente teriam levado a alta divergência genética e possível especiação (Slatkin, 1987; Page *et al.*, 2008).

Contudo, mais recentemente a distribuição de camarões atyídeos tem sido atribuída a capacidade de dispersão do estágio larval marinho (Page *et al.*, 2008; Botello *et al.*, 2013) e, eventos de colonização recente entre América e África, ou mesmo ausência de isolamento geográfico (fluxo gênico), explicariam a baixa divergência existente entre espécies anfi-atlânticas (Murphy & Austin, 2005; Oliveira, 2014; Oliveira *et al.* submetido). De fato, a dispersão larval marinha recente (últimos 3 milhões de anos) entre longas distâncias oceânicas, como os 2,800km que separam a América do Sul da África, é um cenário biogeográfico aceito para diversos táxons de dispersão passiva marinha (Lessios *et al.*, 1999; Muss *et al.*, 2001; Floeter *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2011, Schubart, 2011) incluindo *Atya* (Page *et al.*, 2008; Oliveira, 2014; Oliveira *et al.*, submetido), e os resultados aqui obtidos corroboram essa hipótese.

5.2.2. A questão *A. innocous* (Atlântico/Pacífico)

Os resultados obtidos não sustentaram a decisão de Hobbs & Hart (1982) em sinonimizar as espécies *A. tenella*, presente no Oceano Pacífico (América Central), e *A. innocous*, amplamente distribuída no Mar do Caribe. Visto que duas linhagens foram recuperadas na análise filogenética concatenada e dos genes COI e 16S, as quais suportam a existência de duas espécies, *A. tenella* e *A. innocous* “stricto sensu”. Ainda, altos valores de divergência genética, correspondentes aqueles de distância interespecíficas para o gênero (presente estudo) e família Atyidae (Silva *et al.*, 2011) foram calculados entre essas linhagens (16S: 1,9 a 2,6%; COI: 12,6 a 12,9%). Além disso, todas as análises de delimitação de espécies realizadas com o gene COI suportaram a distinção dessas espécies nas HSE encontradas.

Os próprios autores da sinonímia reconheceram que as populações de *A. innocous* “lato sensu” de cada vertente da América Central tinham, na maior parte das vezes, identidade morfológica distinta (Hobbs & Hart, 1982). Na

realidade a sinonímia feita se baseou apenas no fato de que alguns espécimes de *A. innocous* “sensu stricto” encontrados nas Antilhas (Mar do Caribe) tinham a morfologia indistinguível de *A. tenella* no Pacífico, apesar do contrário não ser notado (Hobbs & Hart, 1982).

Os indivíduos de *A. tenella* têm uma morfologia geral mais delicada e porte menor, apresentando o corpo (especificamente na região dos primeiros segmentos abdominais) mais arqueado, os pereópodes com mais espinhos e o terceiro par de pereópodes menos desenvolvido e sem tubérculos esclerotizados (Abele, 1975; Hobbs & Hart, 1982). Diferentemente dos espécimes de *A. innocous* “stricto sensu”, que geralmente são maiores e mais robustos, especialmente o terceiro par de pereópodos que é bastante desenvolvido com tubérculos esclerotizados, de forma que podem ser confundidos superficialmente com a espécie de morfologia robusta *A. scabra* nas regiões de co-ocorrência (Chace & Hobbs, 1969; Thorpe & Lloid, 1999).

Outros táxons com ampla dispersão marinha, como ouriços-do-mar, peixes e moluscos, antes reconhecidos como espécies distintas para ambas as vertentes da América Central, demonstraram ser, na verdade, casos de espécies irmãs que durante/após o fechamento do Istmo do Panamá, entre 9,2 e 3,2 milhões de anos atrás, adquiriram trajetórias evolutiva próprias (Lessios *et al.*, 1999; Lessios, 2008; Miura *et al.*, 2010; Schubart, 2011; Galván-Quesada *et al.*, 2016; O’Dea *et al.*, 2016). Esse é um padrão biogeográfico também conhecido para camarões carídeos de dispersão marinha (Knowlton & Weigt, 1998; Torati & Mantelatto, 2012; Pileggi *et al.*, 2014) e que pode explicar a divergência entre *A. innocous* “stricto sensu” e *A. tenella* aqui sugerida.

Diante do suporte de dados moleculares obtidos de maneira complementar às características morfológicas já descritas na literatura (Hobbs & Hart, 1982), bem como padrão de distribuição geográfico discreto, o uso do nome *A. tenella* para as populações do Pacífico e *A. innocous* para as do Atlântico, conforme previamente já sugerido por Holthuis (1986) e seguido por alguns autores (Abele & Kim, 1989; Lemaitre & Alvarez-León, 1992), é considerado mais apropriado.

5.2.3. A questão *A. scabra*/*A. margaritacea*

Estudos com dados moleculares demonstraram que *A. margaritacea*, restrita à vertente pacífica da América, não apresentaria nenhuma divergência genética quando comparada à *A. scabra*, amplamente distribuída na vertente Atlântica da América e África, sugerindo que poderiam existir populações de uma mesma espécie recém divergidas sob mesmo nome (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012). Tendo em vista que morfológicamente ambas as espécies apresentam distinção morfológica (Hobbs & Hart, 1982), seria possível existir um caso de plasticidade fenotípica que diferenciariam indivíduos com distribuições distintas apesar de não haver variação genética (Carvalho-Batista *et al.*, 2014; Robles & Felder, 2015).

As sequências de *A. margaritacea* utilizadas nesses trabalhos, e incluídas nas análises do presente estudo, de fato corroboram esse resultado, uma vez que não há divergência entre elas e as das demais amostras de *A. scabra*, bem como as análises filogenéticas posicionam-nas dentro do clado de *A. scabra*. Contudo, todas as sequências de *A. margaritacea* geradas no presente estudo se agruparam como grupo irmão de *A. scabra* e apresentaram divergência suficiente para serem consideradas espécies distintas. É importante ressaltar que todos os espécimes aqui analisados apresentaram morfologia conforme Hobbs & Hart (1982) e que a identificação morfológica realizada no trabalho de Page *et al.* (2008) (origem das sequências do Genbank) foi contestada pelos próprios autores “*However, the identification of our specimen of A. margaritacea is uncertain*” (pag. 75).

Apesar da similaridade superficial entre as espécies, que historicamente levou a identificações erradas (Ortmann, 1895; Bouvier, 1925; Holthuis, 1966; Chace & Hobbs, 1969; Abele, 1975), bem como variabilidade morfológica intraespecífica documentada para ambas (Hobbs & Hart, 1982), não há sobreposição nos caracteres que as diferenciam e a distinção morfológica pode ser feita com base em (1) presença de denticulos esclerotizados na porção ventral da segunda pleura abdominal, presente apenas em *A. scabra*, (2) arranjo dos tubérculos esclerotizados na porção ventral do própodo do terceiro par de pereópodes, que é arranjado em fileiras em *A. scabra*, mas dispersos em *A.*

margaritacea e (3) presença de um lóbulo arredondado na porção distomesial do mero do terceiro par de pereópodes, que é evidente em *A. margaritacea* mas aparece como uma pequena protuberância em *A. scabra* (Hobbs & Hart, 1982; observação pessoal).

O principal motivo do histórico taxonômico com várias espécies descritas e depois sinonimizadas para *A. scabra* e *A. margaritacea*, incluindo alguma indefinição entre essas espécies (revisado por Hobbs & Hart, 1982) pode ser atribuída à variabilidade morfológica intraespecífica (Hobbs & Hart, 1982), ampla distribuição geográfica (De Grave *et al.*, 2013c; d) e incertezas quanto às localidades tipos nas descrições de ambas as espécies (Leach, 1815; Milne-Edwards, 1864). Combinados, esses fatores levaram a um histórico taxonômico no qual poucas variações encontradas em indivíduos de diferentes localidades frequentemente eram descritas como espécies novas, uma vez que se avaliavam os poucos indivíduos conhecidos (Hobbs & Hart, 1982). Tal histórico de procedimentos taxonômicos menos acurados devido a primazia das descobertas e padrões dos estudos pertinentes à época são comuns em táxons descritos há muito tempo e geram necessidades de revisões posteriores (Godfray, 2002; Dayrat, 2005).

Outra questão relacionada à delimitação de *A. scabra* foi recentemente identificada por meio de uma forte estruturação genética relativa às populações do Golfo do México quando comparada as demais localidade de ocorrência (Oliveira, 2014; Oliveira *et al.*, submetido). As análises de delimitação molecular de espécies aqui realizadas com o gene COI, com as sequências provenientes do estudo citado, corroboraram a distinção de espécies distintas dentro de *A. scabra*. Porém, tal resultado deve ser avaliado com cautela, visto que as delimitações de tais análises se limitaram a um marcador molecular.

Os marcadores 16S e H3 não corroboraram o resultado encontrado para o marcador mais variável COI. Assim, na ausência de evidências morfológicas que também suportassem essa distinção (Hobbs & Hart, 1982; observação pessoal), uma postura mais conservadora foi adotada e foram reconhecidas linhagens distintas de uma mesma espécie, que poderiam representar estruturação populacional devido ao isolamento geográfico/reprodutivo ou

mesmo espécies incipientes (Oliveira *et al.*, submetido), em algum estágio da “Zona Cinza” da especiação (Sites & Marshall, 2004; De Queiroz, 2007; Roux *et al.*, 2016). Isso pode ser visto também na distância genética encontrada para o gene COI que sustenta a separação em espécies distintas, mas que não é acompanhada pela divergência de 16S e H3.

Outra espécie foi descrita por Wiegmann (1836), *A. mexicana*, para o Golfo do México, mas antes do reconhecimento de que a localidade tipo de *A. scabra* tivesse sido confirmada para essa região (Misantla, veracruz) (Holthuis, 1966). Contudo análises posteriores demonstraram que as divergências utilizadas na descrição dessa espécie eram variações ontogenéticas e ou plasticidade fenotípica (Milne-Edwards, 1864; Villalobos, 1943; Hobbs & Hart, 1982).

Assim, o presente estudo corrobora a existência de apenas uma espécie de *Atya* para o Golfo do México, aqui identificada como *A. scabra* “linhagem GMx”. Entretanto, caso novas evidências sejam apresentadas para sustentar a existência de uma espécie críptica nessa região, por se tratar da localidade tipo do nome *A. scabra* as populações distribuídas no Mar do Caribe, América do Sul e África precisarão passar por uma revisão de nomenclatura e possivelmente passarem a ser chamadas de *A. sulcatipes*, descrita para ilhas de Cabo Verde (África) por Newport (1847).

Quanto à distribuição anfi-atlântica de *A. scabra*, assim como *A. gabonensis*, a divergência encontrada não suporta a existência de duas espécies distintas, sendo possível que a colonização entre América e África tenha sido recente e por isso não haveria diferenciação genética interespecífica, ou mesmo que fluxo gênico mantenha conectividade genética entre essas populações (Oliveira *et al.*, submetido).

Historicamente autores identificaram diferenças entre *A. sulcatipes* da África e *A. scabra* da América (Oliveira, 1945; Holthuis, 1966; Rutherford, 1971), enquanto outros sugeriam grande similaridade ou consideravam a primeira sinônimo júnior de *A. scabra* (Milne-Edwards, 1864; Ortmann, 1890; Bouvier, 1925; Villalobos, 1943). Diante desta revisão, as diferenças apontadas na distinção de populações americanas daquelas da África se mostraram

contestáveis e foram consideradas variações intraespecíficas (Hobbs & Hart, 1982). Curioso notar que inclusive o próprio autor da descrição de *A. sulcatipes* considerou a possibilidade de estar descrevendo uma variedade de *A. scabra* (Newport, 1847).

A última questão identificada refere-se à distribuição trans-ístmica de *A. scabra*. Existem registros de espécimes coletados na vertente pacífica da América (Panamá, Costa Rica e México) os quais foram atribuídos à introduções antrópicas por Hobbs & Hart (1982), tais introduções são conhecidas para outras espécies com dispersão marinha (e.g. Roy & Sponer, 2002). Um exemplar de *A. scabra* da Costa Rica (Pacífico) foi geneticamente amostrado e não apresentou divergência alguma em relação aos exemplares do Atlântico, o que corrobora a hipótese de introdução antrópica recente para essa região.

É possível que com a abertura do Canal do Panamá em 1914, uma via de passagem tenha sido aberta para indivíduos cruzarem o canal e se estabeleçam na vertente pacífica da América Central (Abele & Kim, 1989; Lessios, 2008). De fato, indivíduos adultos de *A. scabra* são encontrados em lagoas de água doce presentes ao longo do istmo (Abele & Kim, 1989). Além disso, a capacidade osmorreguladora dos adultos permitiriam sobrevivência diante variações de salinidade, inclusive em águas salobras (23 psu) (Rodríguez *et al.*, 1991). Por fim, o desenvolvimento larval dessa espécie ocorre em água com salinidades salobras e marinhas (entre 18 e 35 psu) (Abrunhosa & Moura, 1988; Cruz-Soltero & Alston, 1992; Hernández-Vergara & Jiménez-Rojo, 2008), plasticidade que poderia viabilizar a passagem de indivíduos nesse estágio através do istmo.

Espécimes do México (Pacífico) foram obtidos no presente estudo e identificados morfologicamente como *A. scabra*, contudo não foi possível obter dados genéticos deles. Assim perdura a dúvida se os indivíduos coletados nessa região chegaram por dispersão a partir da América Central ou foram introduzidos independentemente de populações do Golfo do México.

Portanto, dados moleculares corroboraram as hipóteses taxonômicas de *A. margaritacea* e *A. scabra* como espécies distintas. Ainda *A. scabra* apresenta forte estruturação genética no Golfo do México, questão que deve ser melhor

avaliada com novos marcadores genéticos e revisões morfológicas devido a possibilidade da existência de uma espécie críptica. Porém, diante dos dados obtidos até então não existem evidências suficientes que sustentem duas espécies sob mesmo nome.

5.2.4. Posicionamento de *A. ortmannioides*

Na proposta filogenética mais recente da família Atyidae agrupamentos anteriormente reconhecidos, como as propostas de subfamílias, foram refutados (von Rintelen *et al.*, 2012). Com isso, observou-se a necessidade de estudos de sistemática em diferentes níveis taxonômicos dentro da família. Nesse sentido, estudos focados em diferentes gêneros da família têm sido realizados visando contribuir na resolução de problemáticas específicas, como *Potimirim* (Torati & Mantelato, 2012), *Atyaephyra* de Brito Capello, 1867 (Christodoulou *et al.*, 2012), *Typhlatya* Creaser, 1936 (Botello *et al.*, 2013) e *Caridina* H. Milne-Edwards, 1837 (Klotz & von Rintelen, 2014).

Assim, o presente estudo é a primeira tentativa de realizar uma amostragem mais abrangente das espécies do gênero *Atya*, mais especificamente daquelas com questões sistemáticas a serem resolvidas (apresentadas posteriormente). Embora, a realização de uma filogenia do gênero *Atya* não seja o objetivo desse trabalho, não sendo possível discutir as relações filogenéticas entre as espécies desse gênero, a amostragem aqui realizada, a mais completa disponível até o momento, permite discutir a questão levantada sobre a possível não monofilia de *Atya* (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012).

As sequências de *A. ortmannioides* (obtidas no Genbank) que identificaram o gênero *Atya* como não monofilético em estudos anteriores da família Atyidae, todas geradas de um único indivíduo (Page *et al.*, 2008; von Rintelen *et al.*, 2012), foram incluídas nas análises aqui realizadas e corroboraram esse resultado. Contudo, novas sequências geradas para a espécie *A. ortmannioides* não foram agrupadas com aquelas do Genbank, e se posicionaram dentro do clado formado por todas as outras amostras de *Atya*.

Uma vez que os dois espécimes de *A. ortmannioides* amostrados no presente estudo tiveram apenas o gene mais conservado H3 sequenciado, apenas o posicionamento dessas sequências dentro do gênero *Atya* foi suportada e não sua relação com as demais espécies amostradas.

A identificação morfológica dos espécimes de *A. ortmannioides* aqui amostrados deparou-se com uma questão relacionada a hipótese taxonômica da espécie. Existem evidências de que a descrição de *A. ortmannioides* feita por Villalobos (1956) possivelmente ocorreu baseada em indivíduos juvenis (Hobbs & Hart, 1982). Algumas características utilizadas como os espinhos existentes no mero dos pereópodes (quarto e quinto pares) e os dentículos pectinados presentes na superfície flexora do dátilo do quinto par de pereópodes, são características que apresentam variabilidade ontogenética em espécies do gênero, geralmente sendo observados em indivíduos pequenos (possivelmente juvenis), mas não nos adultos (Ortmann, 1897, Hobbs & Hart, 1982; observação pessoal).

Dessa forma, os indivíduos de *A. ortmannioides* aqui amostrados tiveram sua identificação morfológica baseada fundamentalmente no rostro, cujo acúmen é maior do que a base e se estende horizontalmente (Hobbs & Hart, 1982), única característica que permitiu sua separação de indivíduos da espécie *A. tenella*. De fato, indivíduos pequenos como aqueles que constam na descrição de *A. ortmannioides* são similares à espécie de pequeno porte *A. tenella*, restrita à vertente pacífica da América Central (Abele, 1975; Hobbs & Hart, 1982).

Além disso, um espécime oriundo no estado de Oaxaca México, região de distribuição de *A. ortmannioides*, foi identificado morfológicamente como *A. aff. ortmannioides* (Tabela I), pois apesar da similaridade com a espécie, era maior, mais robusto e apresentava o terceiro par de pereópodes mais desenvolvidos. Anteriormente, espécimes similares a *A. ortmannioides*, porém mais robustos e com o terceiro par de pereópodes mais desenvolvidos e ornamentados, haviam sido coletados por Villalobos-Hiriart *et al.* (2010) também nessa região, e chamados de *Atya* sp. 1. Como o desenvolvimento do terceiro par de pereópodes e suas ornamentações é uma das características associadas ao desenvolvimento ontogenético de *Atya* (Hobbs & Hart, 1982; observação

peçoal) é possível que *A. aff. ortmannioides* e *Atya* sp. 1 sejam indivíduos adultos de *A. ortmannioides*. Se correto, as sequências aqui obtidas de *A. aff. ortmannioides* também corroborariam a monofilia do gênero *Atya*.

Apesar da problemática quanto a identificação específica, a espécie *A. ortmannioides* conforme descrita por Villalobos (1956) e revisada por Hobbs & Hart (1982), apresentam todos os caracteres utilizados para a diagnose do gênero *Atya* (Hobbs & Hart, 1982), bem como os espécimes aqui analisados também apresentaram. Tais caracteres, como carpo do segundo par de pereópodes em forma de meia lua, terceiro e quarto par de pereópodes mais desenvolvidos do que os demais e rostro geralmente sem espinhos dorsais, distinguem *A. ortmannioides* (e *Atya* como um todo) dos demais gêneros proximamente relacionados, linhagem “grupo *Atya*” sensu von Rintelen *et al.* (2012) (Chace & Hobbs, 1969; Hothuis, 1993).

Sendo assim, a única evidência para não monofilia do gênero até o momento se baseia em sequências amostradas de um único espécime, o qual não foi analisado morfológicamente no presente estudo. Visto as demais evidências aqui apresentadas, a possibilidade de algum erro na identificação ou durante obtenção dos dados moleculares do espécime previamente amostrado é levantada. Portanto, o posicionamento de *A. ortmannioides* dentro do gênero *Atya* é aqui sugerida também por dados moleculares, mas a avaliação da monofilia do gênero ainda depende da inclusão de novas sequências de *A. ortmannioides* e demais espécies não amostradas até o momento.

5.2.5. Sumário de informações e questões identificadas

Um breve diagnóstico de questões relevantes à sistemática de algumas espécies de *Atya* adquiridas durante o levantamento bibliográfico que embasou o presente estudo é apresentado a seguir. Nesse sentido, as informações sobre as regiões geográficas e países em que as espécies são registradas, suas localidades-tipo, números de catálogo e coleção de depósito do material das séries-tipo são sumarizadas na Tabela VIII. Tais informações reunidas são relevantes particularmente para futuros trabalhos que tenham como objetivo

realizar avaliações sistemáticas e revisões taxonômicas do gênero, mas também podem subsidiar o estabelecimento de estratégias e ações de conservação, estudos de biogeografia, bem como outros aspectos da biologia dos camarões do gênero *Atya*.

Em relação a espécie *A. abelei*, sua descrição taxonômica foi baseada em um único indivíduo macho coletado no Panamá (vertente Pacífica) (Felgenhauer & Abele, 1983) e, com exceção de sua categorização quanto ao *status* de ameaça como “dados insuficientes” (De Grave & Mantelatto, 2013b), nenhum outro registro de novas coletas ou estudos sobre a espécie foi realizado desde então. Assim, as únicas informações disponíveis sobre a espécie consistem nas características descritas do habitat em que foi coletada e sua coloração (Felgenhauer & Abele, 1983; De Grave & Mantelatto, 2013b).

Diante essa ausência de novos registros foi proposto que *A. abelei* poderia ter sido um nome dado a um espécime juvenil de *A. tenella* (De Grave & Mantelatto, 2013b). Porém, o espécime descrito de *A. abelei* foi mantido vivo em um aquário por mais de um ano antes de sua descrição (Felgenhauer & Martin, 1983), e, possivelmente, esse indivíduo já havia completado seu desenvolvimento até o estágio adulto nesse período. A avaliação sistemática dessa espécie com dados moleculares ainda depende da obtenção de sequências do material tipo (único espécime preservado existente) ou de novos espécimes a serem coletados.

De maneira semelhante, a espécie *A. limnetes* não teve nenhum outro registro encontrado além de sua descrição taxonômica há 31 anos (Holthuis, 1986). Apesar dela ter sido citada em uma lista de crustáceos decápodes da Colômbia (Lemaitre & Alvarez-León, 1992), nenhum novo espécime havia sido coletado na ocasião, sendo que essa citação foi realizada com base na descrição original da espécie. Curiosamente dois trabalhos publicados recentemente nos quais a diversidade de camarões de água doce da Colômbia foi inventariada não mencionaram a ocorrência de *A. limnetes* para esse país (Campos, 2014; Campos *et al.*, 2015).

Isto posto, a geração de sequências de DNA para essa espécie depende do material de sua série-tipo, o qual foi acessado no presente estudo mas sem

sucesso. A inclusão dessa espécie, “*a quite aberrant member of the genus*” segundo Holthuis (1986, pag. 444), em uma avaliação de filogenia molecular seria particularmente de interesse, uma vez que ela apresenta características morfológicas destoantes daquelas que caracterizam o gênero *Atya*, como o desenvolvimento de espinhos no mero do quarto par de pereópodes e os dentes na porção dorsal do rostro com aspecto único no gênero (Holthuis, 1986).

A única espécie com adaptações troglomórficas do gênero *Atya*, *A. brachyrhinus* (Hobbs & Hart, 1982; Hobbs III, 1994), foi recentemente considerada possivelmente extinta (De Grave *et al.*, 2013a; 2015). Essa espécie foi descrita em 1982 com base em espécimes coletados mais de 10 anos antes (Hobbs & Hart, 1982) e, apesar de novas tentativas de coleta realizadas em 2005, não foi encontrada novamente na caverna a qual é endêmica (Barbados) (De Grave *et al.*, 2013a). Diante disso a obtenção de dados moleculares para essa espécie deve depender do material da série-tipo de *A. brachyrhinus*, os quais não resultaram em sequências com qualidade satisfatória para a inclusão destas espécies nas análises do presente estudo.

Uma reavaliação taxonômica para a espécie *A. ortmannioides* é sugerida no presente estudo, conforme discutido anteriormente devido a possível necessidade da descrição de um indivíduo adulto dessa espécie, ou ainda da possibilidade de uma nova espécie para região de Oaxaca (México), previamente designada como *Atya* sp. (Villalobos-Hiriart *et al.*, 2010) ou *A. aff. ortmannioides* (presente estudo). Tendo em vista que *A. ortmannioides* é considerada “Vulnerável” devido sua área de ocorrência na costa mexicana estar sob intensa influência antrópica (Villalobos *et al.*, 2013), a correta delimitação desse táxon é uma questão relevante para sua própria conservação.

Após a revisão de Hobbs & Hart (1982), a espécie *A. dressleri*, antes tida como endêmica à costa pacífica do Panamá, foi registrada também para a Venezuela (Mar do Caribe) (Pereira, 1991; Delgado *et al.*, 1997). Contudo, ao realizar o novo registro, Pereira (1991) evidenciou algumas variações morfológicas (comprimento do rostro, ângulo do espinho pterigostomial e aspecto do apêndice masculino) e no padrão de coloração descrito em relação à *A. dressleri* do Panamá (Abele, 1975).

Assim, um estudo que compare espécimes dessas duas regiões é necessário, não apenas para a resolução sistemática, mas também para a própria conservação da espécie, visto que *A. dressleri* não foi considerada ameaçada (“menos preocupante”) principalmente devido a essa suposta distribuição anfi-atlântica (De Grave *et al.*, 2013e).

Tabela VIII (continua): Espécies válidas do gênero *Atya* Leach, 1816 de acordo com De Grave & Fransen (2011) e o presente estudo, incluindo informações sobre suas distribuições geográficas, localidades-tipo e lotes das séries-tipo [informações obtidas em Escobar (1979), Hobbs & Hart (1982), Felgenhauer & Martin (1983), Holthuis (1986)] e referências listadas nas tabelas VIII e IX). *Espécies foco do presente estudo cujas distribuições geográficas foram representadas graficamente na Figura 2 e 6-B. Na coluna “Países de ocorrência registrada” os nomes sublinhados correspondem ao país da localidade tipo. H: Holótipo; A: Alótipo; P: Parátipo; S: Síntipo; N: Neótipo. CNCR: Colección Nacional de Crustaceos do Instituto de Biología da Universidad Nacional Autónoma de México, Cidade do México, México; MCZ: Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, EUA; MNHN: Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, França; MZ-UCR: Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; NHM: Natural History Museum, Londres, Reino Unido; PM: Peabody Museum of Natural History, Yale University, New Haven, EUA; RMNH: Naturalis Biodiversity Center, Leiden, Holanda; USNM: National Museum of Natural History; Smithsonian Institution, Washington, EUA.

Espécie	Região geográfica de distribuição	Países de ocorrência registrada	Localidade-tipo	Material série-tipo
<i>Atya abelei</i>	América Central (Pacífico)	<u>Panamá</u>	El Valle de Antón, Província de Coclé, tributário do Rio Antón	USNM 195335 (H)
<i>Atya africana</i>	África (Golfo da Guiné)	Libéria, Costa do Marfim, Nigéria, Camarões, <u>Gabão</u> e Congo	"Samkitta, dans la rivière Ogooué"	MNHN 593 (H)
<i>Atya brachyrhinus</i>	Pequenas Antilhas	<u>Barbados</u>	Cole's Cave, 13°10'40"N 59°34'3"W	NHM 1972:539 (H)
<i>Atya crassa</i>	América do Norte, Central e do Sul (Pacífico)	México, El Salvador, <u>Nicarágua</u> , Costa Rica, Panamá, Colômbia e Equador	Polvon, Rio Fulva, perto de Realejo	USNM 84261 e PM 6038
<i>Atya dressleri</i>	América Central (Pacífico) e do Sul (Mar do Caribe)	<u>Panamá</u> e Venezuela	Província de Veraguas, Rio Santa María, próximo de Calobre	USNM 184856 (H) e 141845 (P)
<i>Atya gabonensis</i> *	África e América do Sul (Atlântico)	Senegal, Libéria, Mali, Gana, Nigéria, Camarões, <u>Gabão</u> , Congo, São Tomé e Príncipe, Venezuela, Suriname e Brasil	Gabão	Desconhecido

Tabela VIII (conclusão)

Espécie	Região geográfica de distribuição	Países de ocorrência registrada	Localidade-tipo	Material série-tipo
<i>Atya innocous</i> *	América Central Continental e Insular (Mar do Caribe)	Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana, Porto Rico, Saint Croix, São Tomás, Monserrate, Guadalupe, Dominica, <u>Martinica</u> , Santa Lúcia, São Vicente e Granadinas, Barbados, Granada, Trinidad e Tobago, Curaçao, Nicarágua, Costa Rica, Panamá e Colômbia	Martinica	Não existente
<i>Atya intermedia</i>	África (Golfo da Guiné)	<u>São Tomé e Príncipe</u> e Guiné Equatorial	Ilha de São Tomé	Não existente
<i>Atya lanipes</i>	América Central Insular (Mar do Caribe)	Cuba, Jamaica, Porto Rico, República Dominicana, Saint Croix, Santa Lúcia, <u>São Tomás</u> e Colômbia	São Tomás	RMNH2338 (H e P)
<i>Atya limnetes</i>	América do Sul (Pacífico)	<u>Colômbia</u>	Rio Anchicaya, Valle del Cauca	RMNH 36331 (H e P)
<i>Atya margaritacea</i> *	América do Norte, Central e do Sul (Pacífico)	México, Guatemala, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Peru e Equador	Provavelmente vertente pacífica da América	MNHN 601 (S)
<i>Atya ortmannioides</i>	América do Norte (Pacífico)	<u>México</u>	Rio de las Truchas, La Mira, perto de Arteaga, Michoacan	CNCR 21153 (H/A) e USNM 99527 (P)
<i>Atya scabra</i> *	África (Atlântico) e América (Atlântico, Golfo do México, Mar do Caribe e Pacífico)	Libéria, Gana, Camarões, Gabão, Congo, Angola, Cabo Verde, Guiné Equatorial, São Tomé e Príncipe, Cuba, Jamaica, República Dominicana, Haiti, Porto Rico, São Cristóvão e Nevis, Monserrate, Guadalupe, Dominica, Martinica, Santa Lúcia, Granada, Trinidad e Tobago, Curaçao, <u>México</u> , Guatemala, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela e Brasil	Provavelmente Misanthla, Estado de Veracruz, Mexico	NHM 1952-9-25-1-5 (N)
<i>Atya tenella</i>	América Central (Pacífico)	<u>Nicarágua</u> , Costa Rica, Panamá e Colômbia	El Polvon, Occidental Department, Nicarágua	MCZ 315 (S) e PM 1785 (S)

6. CONCLUSÃO

A avaliação das hipóteses taxonômicas das espécies alvo do presente estudo com dados moleculares corroboraram *A. gabonensis* como uma espécie de distribuição geográfica anfi-atlântica. Contrariamente, a proposição de *A. innocous* como sinônimo sênior de *A. tenella* não foi sustentada. Uma vez que esses resultados obtidos são também amparados por dados morfológicos, o uso do nome *A. innocous* para as populações distribuídas no mar do Caribe, e *A. tenella* para as populações restritas à vertente pacífica da América Central é sugerido. As já revisadas variações morfológicas entre *A. margaritacea* e *A. scabra* foram corroboradas por novas sequências de DNA geradas no presente estudo. Assim, *A. scabra* é amplamente distribuída ao longo das costas atlânticas americanas e africanas, com registros de introduções recentes na vertente pacífica da América. A existência de uma espécie críptica representada pela linhagem de *A. scabra* restrita ao Golfo do México deve ser melhor avaliada por meio de uma revisão taxonômica e outros marcadores moleculares. Por fim, exemplares de *A. ortmannioides* aqui amostrados ficaram posicionados juntamente às demais espécies do gênero, corroborando *Atya* como um táxon monofilético de acordo com os dados morfológicos e moleculares disponíveis até agora. Diante disso, os dados moleculares gerados no presente estudo e utilizados em diferentes análises com finalidade de delimitar espécies auxiliaram na avaliação da sistemática do gênero *Atya* e suas espécies, sendo que a discussão aqui apresentada contribui para o conhecimento da diversidade e classificação dos camarões de água doce da família Atyidae.

7. REFERÊNCIAS

- Abele, L.G. 1975. A new species of freshwater shrimp (genus *Atya*) from the Pacific drainages of Panama. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 88: 51-58.
- Abele, L.G. & W. Kim. 1989. The decapod crustaceans of the Panama Canal. **Smithsonian Contributions to Zoology**, 482: 1-50.
- Abrunhosa, F.A. & M.G. Moura. 1988. O completo desenvolvimento larval do camarão *Atya scabra* (Leach) (Crustacea: Decapoda: Atyidae), cultivado em Laboratório. **Arquivo Ciências do Mar**, 27: 127-146.
- Agapow, P.M.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Crandall, K.A.; Gittleman, J.L.; Mace, G.M.J.; Marshall, C. & A. Purvis. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. **The Quarterly Review of Biology**, 79: 161-179.
- Almada, F.; Levy, A. & J.I. Robalo. 2016. Not so sluggish: the success of the *Felimare picta* complex (Gastropoda, Nudibranchia) crossing Atlantic biogeographic barriers. **PeerJ**, 4: e1561.
- Almeida, A.O.; Mossolin, E.C. & J.R. Luz. 2010. Reproductive biology of the freshwater shrimp *Atya scabra* (Leach, 1815) (Crustacea: Atyidae) in Ilhéus, Bahia, Brazil. **Zoological Studies**, 49 (2): 243-252.
- Arrigoni, R.; Berumen, M.L.; Chen, C.A.; Terraneo, T.I.; Baird, A.H.; Payri, C. & F. Benzoni. 2016. Species delimitation in the reef coral genera *Echinophyllia* and *Oxypora* (Scleractinia, Lobophylliidae) with a description of two new species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 105: 146-159.
- Avice, J.C. 2000. **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, 464 p.
- Avice, J.C. 2004. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, 541 p.
- Aurivillius, C.W.S. 1898. Krustaceen aus dem Kamerun-Gebiete. **Bihang till Kungliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar**, 24: 1-31.

- Aznar-Cormano, L.; Brisset, J.; Chan, T.Y.; Corbari, L.; Puillandre, N.; Utge, J.; Zbinden, M.; Zuccon, D. & S. Samadi. 2015. An improved taxonomic sampling is a necessary but not sufficient condition for resolving inter-families relationships in caridean decapods. **Genetica**, 143: 195-205.
- Ballard, J.W.O. & M.C. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, 13: 729-744.
- Bauer, R.T. 2004. **Remarkable Shrimps: Natural History and Adaptations of the Carideans**. University of Oklahoma Press, Norman, 316 p.
- Bauer, R.T. 2011. 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, 15: 157-168.
- 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. & C.M. Pringle. 2000. Estuarine larval development and upstream post-larval migration of freshwater shrimps in two tropical rivers of Puerto Rico. **Biotropica**, 32 (3): 545-548.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K. & I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22 (3): 148-155.
- Bortolus, A. 2008. Error cascades in the biological sciences: The unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, 37 (2):114-118.
- Botello A.; Iliffe, T.M.; Alvarez, F.; Juan, C.; Pons, J. & D. Jaume. 2013. Historical biogeography and phylogeny of *Typhlatya* cave shrimps (Decapoda: Atyidae) based on mitochondrial and nuclear data. **Journal of Biogeography**, 40: 594-607.

- Bouvier, E.L. 1904. Crevettes de la famille des Atyidés: espèces qui font partie des collections du Muséum d'Histoire Naturelle. **Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle**, 10: 129-138.
- Bouvier, E.L. 1925. Recherches sur la morphologie, les variations et la distribution systématique des crevettes d'eau douce de la famille des Atyidés. **Encyclopédie Entomologique**, 4: 1-365.
- Bracken, H.D.; De Grave, S. & Felder, D.L. (2009). Phylogeny of the infraorder Caridea based on mitochondrial and nuclear genes (Crustacea: Decapoda). *In*: Martin, J.W.; Crandall, K.A. & D.L. Felder (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues**, 18: 281-305.
- Bracken-Grissom, H.D.; Robles, R. & D.L. Felder. 2014. Molecular phylogenetics of American snapping shrimps allied to *Alpheus floridanus* Kingsley, 1878 (Crustacea: Decapoda: Alpheidae). **Zootaxa**, 3895 (4): 492-502.
- Brown, W.M.; George, M., Jr. & A.C. Wilson. 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. & Allen, 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.
- Burkhardt, F. & S. Smith. 1990. **The Correspondence of Charles Darwin**. Vol. 6, 1856-1857. Cambridge University Press, Cambridge, 720 p.
- Campos, M.R. 2014. **Crustáceos decápodos de agua dulce de Colombia**. Biblioteca José Jerónimo Triana del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 691 p.

- Campos, M.R.; Lasso, C.A. & A. Acevedo. 2015. Camarones asociados a las aguas pericontinentales (ríos, quebradas y arroyos costeros), de la vertiente Caribe y Pacífico, incluyendo la región insular de Colombia. *In*: Lasso, C.A.; Blanco-Libreros, J.F. & P. Sánchez-Duarte. (Eds.). **XII. Cuencas pericontinentales de Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela: tipología, biodiversidad, servicios ecosistémicos y sostenibilidad de los ríos, quebradas y arroyos costeros**. Série Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, 119-138.
- Carstens, B.C.; Pelletier, T.A.; Reid, N.M. & J.D. Satler. 2013. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, 22: 4369-4383.
- Carvalho, M.R.; Bockmann, F.A.; Amorim, D.S.; Brandão, C.R.F. Vivo, M.; Figueiredo, J.L.; Britski, H.A., Pinna, M.C.C.; Menezes, N.A.; Marques, F.P.L.; Papavero, N.; Cancellato, E.M.; Crisci, J.V.; McEachran, J.D.; Schelly, R.C.; Lundberg, J.G.; Gill, A.C.; Britz, R.; Wheeler, Q.D.; Stiassny, M.L.J.; Parenti, L.R.; Page, L.M.; Wheeler, W.C.; Faivovich, J.; Vari, R.P.; Grande, L.; Humphries, C.J.; DeSalle, R.; Ebach, M.C. & G.J. Nelson. 2007. Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic-automation paradigm. **Evolutionary Biology**, 3/4: 140-143.
- Carvalho-Batista, A.; Negri, M.; Pileggi, L.G.; Castilho, A.L.; Costa, R.C. & F.L. Mantelatto. 2014. Inferring population connectivity across the range of distribution of the stiletto shrimp *Artemesia longinaris* Spence Bate, 1888 (Decapoda, Penaeidae) from DNA barcoding: implications for fishery management. **ZooKeys**, 457: 271-288.
- Castelin, M.; Marquet, G. & W. Klotz. 2013. *Elephantis*, a new genus for *Caridina natalensis* Bouvier, 1925 from eastern rivers of Madagascar. **Zootaxa**, 3702 (6): 573-586.

- 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. 1983. The *Atya*-like shrimp of the Indo-Pacific region (Decapoda: Atyidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 384: 1-54.
- Chace, F.A., Jr. 1992. On the classification of the Caridea (Decapoda). **Crustaceana**, 63 (1): 70-80.
- Chace, F.A., Jr. & H.H., Jr. Hobbs. 1969. The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica. **United States National Museum Bulletin**, 292: 1-258.
- Christodoulou, M.; Antoniou, A.; Magoulas, A. & A. Koukouras. 2012. Revision of the freshwater genus *Atyaephyra* (Crustacea, Decapoda, Atyidae) based on morphological and molecular data. **ZooKeys**, 229: 53-110.
- Coat, S.; Monti, D.; Bouchon, C. & G. Lepoint. 2009. Trophic relationships in a tropical stream food web assessed by stable isotope analysis. **Freshwater Biology**, 54: 1028-1041.
- Colgar D.J.; McLauchlan, A.; Wilson, G.D.F.; Livingston, S.P. & G.D. Edgecombe. 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, 46: 419-437.
- Cook, B.D.; Baker, A.M.; Page, T.J.; Grant, S.C.; Fawcett, J.H.; Hurwood, D.A. & J.M. Hughes. 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. & J.M. Hughes. 2010. Immigration history of amphidromous species on a Greater Antillean island. **Journal of Biogeography**, 37: 270-277.

- Cook, L.J.; Edwards, R.D.; Crisp, M.D. & N.B. Hardy. 2010. Need morphology always be required for new species descriptions?. **Invertebrate Systematics**, 24: 322-326.
- Costa, F.O.; Dewaard, J.R.; Boutillier, J.; Ratnasingham, S.; Dooh, R.T.; Hajibabaei, M. & D.N. Hebert. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 64 (2): 272-295.
- Costello, M.J.; May, R.M. & N.E. Stork. 2013. Can we name Earth's species before they go extinct? **Science**, 339: 413-416.
- Cross, W.F.; Covich, A.P.; Crowl, T.A.; Benstead, J.P. & A. Ramírez. 2008. Secondary production, longevity and resource consumption rates of freshwater shrimps in two tropical streams with contrasting geomorphology and food web structure. **Freshwater Biology**, 53 (12): 2504-2519.
- Crowl, T.A. & A.P. Covich. 1994. Responses of a freshwater shrimp to chemical and tactile stimuli from a large decapod predator. **Journal of the North American Benthological Society**, 13 (2): 291-298.
- Crowl, T.A.; McDowell, W.H.; Covich, A.P. & S.L. Johnson. 2001. Freshwater shrimp effects on detrital processing and nutrients in a tropical headwater stream. **Ecology**, 82 (3): 775-783.
- Cruz-Soltero, S. & D.E. Alston. 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.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9 (8): 772.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, 85: 407-415.

- Deepak, J. & M. Harikrishnan. 2016. Non-homologous COI barcode regions: a serious concern in decapod molecular taxonomy. **Mitochondrial DNA Part A**, doi: 10.3109/19401736.2015.1137902.
- Delgado, J.G.; Severeyn, H.J.; Godoy, A.R.; Reverol, Y.M. & J.J Ewald. 1997. Camarones dulceacuícolas y estuarinos de venezuela (Atyidae, Palaemonidae): Nuevos registros para los estados Zulia y Falcón. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, 31 (1): 11-32.
- DeSalle, R.; Egan, M.G. & M. Siddall. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society (B)**, 360: 1905-1916.
- De Grave, S. 2013. *Atya intermedia*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, e.T198041A2509395.
- De Grave, S. & C.H.J.M. Fransen. 2011. Carideorum Catalogus: The recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen**, 85: 195-588.
- De Grave, S. & F.L. Mantelatto. 2013a. *Atya gabonensis* (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T198241A107023029.
- De Grave, S. & F.L. Mantelatto. 2013b. *Atya abelei*. (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species 2013**: e.T197610A107022447.
- De Grave, S. & T.J. Page. 2014. The status of the Australian genus *Caridinides* Calman, 1926 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) with reference to recent phylogenetic studies. **Zootaxa**, 3753 (4): 398-400.
- De Grave, S.; Cai, Y. & A. Anker. 2008. Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595: 287-293.

- De Grave, S.; Pentcheff, N.D.; Ah Yong, 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. & R.A. Wetzer. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, 21: 1-109.
- De Grave, S.; Mantelatto, F.L. & W. Klotz. 2013a. *Atya brachyrhinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, e.T197803A107022619.
- De Grave, S.; Mantelatto, F.L.; Alvarez, F. & J. Villalobos. 2013b. *Atya innocous*. (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species 2013**: e.T197934A107023334.
- De Grave, S.; Villalobos, J. & F. Alvarez. 2013c. *Atya margaritacea*. **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T197690A2496168.
- De Grave, S.; Villalobos, J.; Mantelatto, F.L. & F. Alvarez. 2013d. *Atya scabra*. (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T197895A107024088.
- De Grave, S.; Mantelatto, F.L.; Alvarez, F. & J. Villalobos. 2013e. *Atya dressleri*. (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T197691A107022848.
- De Grave, S.; Smith, K.G.; Adeler, N.A.; Allen, D.J.; Alvarez, F.; Anker, A.; Cai, Y.; Carrizo, S.F.; Klotz, W.; Mantelatto, F.L.; Page, T.J.; Shy, J.-Y.; Villalobos, J.L. & D. Wowor. 2015. Dead shrimp blues: A global assessment of extinction risk in freshwater shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea). **PLoS ONE**, 10 (3): e0120198.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, 56 (6): 879-886.
- Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D. & A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, 29 (8): 1969-1973.

- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32 (5): 1792-1797.
- Escobar, J.G. 1979. Carídeos (Palaemonidae y Atyidae) en los ríos de la región de Santa Marta. **Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta de Betin**, 11: 93-134.
- Ezard, T.; Fujisawa, T. & T.G. Barraclough. 2009. SPLITS: SPecies' Llimits by Threshold Statistics. R package version 1.0-18/r45. Disponível em: <URL <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>>, Acesso em: jan/2017.
- Felgenhauer, B.E. & J.W. Martin. 1983. *Atya abelei*, a new atyid shrimp (Crustacea, Decapoda, Atyidae) from the Pacific slope of Panama. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 96: 333-338.
- Felgenhauer, B.E. & L.G. Abele. 1985. Reviewed feeding structures of two atyid shrimps, with comments on caridean phylogeny. **Journal of Crustacean Biology**, 5 (3): 397-419.
- Felsenstein, J. 1973. Maximum Likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. **Systematic Biology**, 22 (3): 240-249.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a Maximum Likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39 (4): 783-791.
- Fièvet, E.; Doledec, S. & P. Lim. 2001. Distribution of migratory fishes and shrimps along multivariate gradients in tropical island streams. **Journal of Fish Biology**, 59: 390-402.
- Floeter, S.R.; Rocha, L.A.; Robertson, D.R.; Joyeux, J.C.; Smith-Vaniz, W.F.; Wirtz, P.; Edwards, A.J.; Barreiros, J.P.; Ferreira, C.E.L.; Gasparini, J.L.; Brito, A.; Falcon, J.M.; Bowen, B.W. & G. Bernardi. 2008. Atlantic reef fish biogeography and evolution. **Journal of Biogeography**, 35: 22-47.

- Fonseca, K.M.L.; Ostrovski, M.C. & T.C.G. Silva-Ferreira. 1994. Ocorrência de *Atya gabonensis* Giebel, 1875 (Crustacea: Decapoda: Atyidae) na Bacia do Rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Nauplius**, 2: 129-130.
- Fransen, C.H.J.M. & S. De Grave. 2009. Evolution and radiation of shrimplike decapods: an overview. *In*: Martin, J.W.; Crandall, K.A. & D.L. Felder (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues**, 18: 246-259.
- Frézal, L. & R. Leblois. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, 8: 727-736.
- 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)**, 277 (952): 57-128.
- Fujisawa, T. & T.G. Barraclough. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. **Systematic Biology**, 62: 707-724.
- Fujita, M.K.; Leache, A.D.; Burbrink, F.T.; McGuire, J.A. & C. Moritz. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, 27 (9): 480-488.
- Galtier, N.; Nabholz, B.; Glémin, S. & G.D.D. Hurst. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, 18: 4541-4550.
- Galván-Quesada, S.; Doadrio, I.; Alda, F.; Perdices, A.; Reina, R.G.; Varela, M.G.; Hernández, N.; Mendoza, A.C.; Bermingham, E. & O. Domínguez-Domínguez. 2016. Molecular phylogeny and biogeography of the amphidromous fish genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). **PLoS One**, 11 (4): e0153538.

- Galvão, R. & S.L.S. Bueno. 2000. Population structure and reproductive biology of the Camacuto shrimp, *Atya scabra* (Decapoda, Caridea, Atyidae), from São Sebastião, Brazil. *In*: Schram, F.R. & J.C. Von Vaupel Klein (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.
- Giebel, C.G. 1875. *Atya gabonensis*, neuer Krebse aus Gabon. **Zeitschrift für die Gesamten Naturwissenschaften**, 45: 52-55.
- Godfray, H.C.J. 2002. Challenges for taxonomy. **Nature**, 417: 17-19.
- Goldstein, P.Z. & R. DeSalle. 2010. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **Bioessays**, 33: 135-147.
- Hall, T.A. 2005. BioEdit v.7.0.5. Biological sequences alignment editor for Windows. Ibis Therapeutics a division of Isis pharmaceutical. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> Acesso em: jun/2016.
- Hart, C.W., Jr. 1961. The freshwater shrimps (Atyidae and Palaemonidae) of Jamaica, W. I.. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 113 (4): 61-80.
- Hasegawa, M.; Kishino, H. & T. Yano. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, 22 (2): 160-174.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & J.R. DeWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**, 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N.; Ratnasingham, S. & J.R. DeWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B**, 270: 96-99.
- Hebert, P.D.N.; Stoeckle, M.Y.; Zemplak, T.S. & C.M. Francis. 2004a. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, 10 (2): 1658-1663.

- Hebert, P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H. & W. Hallwachs. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101 (41): 14812-14817.
- Hein, C.L. & T.A. Crowl. 2010. Running the predator gauntlet: do freshwater shrimp (*Atya lanipes*) migrate above waterfalls to avoid fish predation?. **Journal of the North American Benthological Society**, 29 (2): 431-443.
- Hernández-Vergara, M.P. & S. Jiménez-Rojo. 2008. Desarrollo larval y supervivencia de *Atya scabra* (Crustacea: Decapoda: Atyidae), a diferentes salinidades de cultivo. **Ciencia Pesquera**, 16: 17-24.
- Hill, G.E. 2016. Mitonuclear coevolution as the genesis of speciation and the mitochondrial DNA barcode gap. **Ecology and Evolution**, 6 (16): 5831-5842.
- Hillis, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Annual Review Ecology and Systematics**, 18: 23-42.
- Hobbs, H.H., Jr. 1980. *Atya gabonensis* (Decapoda, Atyidae) in the Western Hemisphere. **Crustaceana**, 38 (1):111
- Hobbs, H.H., Jr. & C.W.J., Jr. Hart. 1982. The shrimp genus *Atya* (Decapoda: Atyidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 364: 1-143.
- Hobbs III, H.H. 1994. Biogeography of subterranean decapods in North and Central America and the Caribbean region (Caridea, Astacidea, Brachyura). **Hydrobiologia**, 287: 95-104.
- Holthuis, L.B. 1951. The caridean Crustacea of tropical West Africa. **Atlantide Report**, 2: 7-187.
- Holthuis, L.B. 1963. Two new species of fresh-water shrimp (Crustacea Decapoda) from the West Indies. **Proceedings of Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (C)**, 66 (1): 61-69.

- Holthuis, L.B. 1966. The R/V Pillsbury deep-sea biological expedition to the Gulf of Guinea, 1964-65. The freshwater shrimps of the Island of Annobon, West Africa. **Studies in Tropical Oceanography**, 4: 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.
- Holthuis, L.B. 1986. Fresh-water shrimps of the family Atyidae (Crustacea: Decapoda) from western Colombia. **Journal of Crustacean Biology**, 6: 438-445.
- Holthuis, L.B. 1993. **The recent genera of the caridean and stenopodidean shrimps (Crustacea, Decapoda) with an appendix on the order Amphionidacea**. Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden, 328 p.
- Holýński, 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.
- Huelsenbeck, J.P. & F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, 17: 754-755.
- Hunte, W. 1979. The complete larval development of the freshwater shrimp *Atya innocous* (Herbst) reared in the laboratory (Decapoda, Atyidae). **Crustaceana**, Supplement 5: 231-242.
- James, J.E.; Piganeau, G. & A. Eyre-Walker. 2016. The rate of adaptive evolution in animal mitochondria. **Molecular Ecology**, 25: 67-78.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P. & A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28 (12): 1647-1649.

- 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.
- Kingsley, J.S. 1878. Notes on the North American Caridea in the Museum of the Peabody Academy of Science at Salem, Mass. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 1878: 89-98.
- Klotz, W. & T. von Rintelen. 2014. To “bee” or not to be - on some ornamental shrimp from Guangdong Province, Southern China and Hong Kong SAR, with descriptions of three new species. **Zootaxa**, 3889 (2): 151-184.
- Knowlton, N. 1986. Cryptic and sibling species among the Decapod Crustacea. **Journal of Crustacean Biology**, 6 (3): 356-363.
- Knowlton, N. & L.A. Weigt. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society Series B**, 265: 2257-2263.
- Koelbel, C. 1884. Carcinologisches. **Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademieder Wissenschaften Wien**, 90 (1): 312-323.
- Leach, W.E. 1815. A Tabular view of the external characters of four classes of animals, which Linné arranged under Insecta, with the distribution of the genera composing three of these classes into orders, 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 Britannica, supplement to the fourth, fifth and sixth editions. Archibald Constable and Company, Edinburgh, 421 p.
- Lefébure, T.; Douady, C.J.; Gouy, M. & J. Gibert. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 40: 435-447.

- Lefrançois, E.; Coat, S.; Lepoint, G.; Vachiéry, N.; Gros, O. & D. Monti. 2011. Epilithic biofilm as a key factor for small-scale river fisheries on Caribbean islands. **Fisheries Management and Ecology**, 18: 211-220.
- Lemaitre, R. & R. Alvarez-León. 1992. Crustaceos decapodes del Pacífico Colombiano: lista de especies y consideraciones zoogeográficas. **Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín**, 21: 33-76.
- Lessios, H.A. 2008. The great American Schism: Divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 39: 63-91.
- Lessios, H.A.; Kessing, B.D.; Robertson, D.R. & G. Paulay. 1999. Phylogeography of the pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. **Evolution**, 53 (3): 806-817.
- Magalhães, T.; Robles, R.; Felder, D.L. & F.L. Mantelatto. 2016. Integrative taxonomic study of the purse crab genus *Persephona* Leach, 1817 (Brachyura: Leucosiidae): combining morphology and molecular data. **PLoS One**, 11 (4): e0152627.
- Mantelatto, F.L.; Robles, R.; Biagi, R. & D.L. Felder. 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.; Torati, L.S.; Pileggi, L.G.; Mossolin, E.C.; Terossi, M.; Carvalho, F.L.; Rocha, S.S. & C. Magalhães. 2016. Avaliação dos Camarões Atídeos (Decapoda: Atyidae). In: **Livro vermelho dos crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014**. Pinheiros, M. & H. Boos (Eds.). Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, Porto Alegre, 93-102.
- 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. & G. Marcgraf, (Eds.) **Historia naturalis Brasiliae**, 293 p.

- March, J.G. & C.M. Pringle. 2003. Food web structure and basal resource utilization along a tropical island stream continuum, Puerto Rico. **Biotropica**, 35 (1): 84-93.
- March, J.G.; Pringle, C.M.; Townsend, M.T. & A.I. Wilson. 2002. Effects of freshwater shrimp assemblages on benthic communities along an altitudinal gradient of a tropical island stream. **Freshwater Biology**, 47: 377-390.
- Martin, J.W. & G.E. Davis. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. **Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series**, 39: 1-124.
- Martínez-Mayén, M.; Román-Contreras, R.; Rocha-Ramírez, A. & S. Chazaro-Olvera. 2000. Relative growth of *Atya margaritacea* A. Milne-Edwards, 1864 (Decapoda, Atyidae) from the southern pacific coast of Mexico. **Crustaceana**, 73 (5): 525-534.
- 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.
- Melo, G.A.S. 2003. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. Edições Loyola, São Paulo, 430 p.
- Miller, M.A.; Pfeiffer, W. & T. Schwartz. 2010. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees**. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, 1-8.
- Milne-Edwards, A. 1864. Revision des Crustaces Macroures de la famille des Atyoidees. **Annales de la Société Entomologique de France**, 4 (4): 145-152.
- Miranda, I.; Schubart, C.D. & F.L. Mantelatto. 2014. Morphological and molecular data support the distinctiveness of *Pachycheles laevidactylus* Ortmann, 1892 and *Pachycheles chubutensis* Boschi, 1963 (Anomura, Porcellanidae). **Zootaxa**, 3852 (1): 118-132.

- Miura, O.; Torchin, M.E. & E. Bermingham. 2010. Molecular phylogenetics reveals differential divergence of coastal snails separated by the Isthmus of Panama. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 56: 40-48.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. **Evolution**, 49 (4): 718-726.
- Moritz, C.; Dowling, T.E. & W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 269-292.
- Murphy, N.P. & C.M. Austin. 2005. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. **Zoologica Scripta**, 34 (2): 187-197.
- Muss, A.; Robertson, D.R.; Stepien, C.A.; Wirtz, P. & B.W. Bowen. 2001. Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. **Evolution**, 55 (3): 561-572.
- Newport, G. 1847. Note on the genus *Atya* of Leach, with descriptions of four apparently new species, in the cabinets of the British Museum. **The Annals and Magazine of Natural History**, (1) 19: 158-160.
- Nichols, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. **Trends in Ecology & Evolution**, 16 (7): 358-364.
- Nunes, F.L.D.; Norris, R.D. & N. Knowlton. 2011. Long distance dispersal and connectivity in amphi-atlantic corals at regional and basin scales. **PLoS ONE**, 6 (7): e22298.
- Obregón, F.C. 1986. **Contribution to the knowledge of freshwater prawns of Costa Rica**. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José. San José. (Práctica Dirigida Licenciatura en Biología), 46 p.

- O'Dea, A.; Lessios, H.A.; Coates, E.R.I.; Restrepo-Moreno, S.A.; Cione, A.L.; Collins, L.S.; De Queiroz, A.; Farris, D.W.; Norris, R.D.; Stallard, R.F.; Woodburne, M.O.; Aguilera, O.; Aubry, M.; Berggren, W.A.; Budd, A.F.; Cozzuol, M.A.; Coppard, S.E.; Duque-Caro, H.; Finnegan, S.; Gasparini, G.M.; Grossman, E.L.; Johnson, K.G.; Keigwin, L.D.; Knowlton N.; Leigh, E.G.; Leonard-Pingel, J.S.; Marko, P.B.; Pyenson, N.D.; Rachello-Dolmen, P.G.; Soibelzon, E.; Soibelzon, L.; Todd, J.A.; Vermeij, G.J. & J.B.C. Jackson. 2016. Formation of the Isthmus of Panama. **Science Advances**, 2: e1600883.
- Olguín, N. & F.L. Mantelatto. 2013. Molecular analysis validates of some informal morphological groups of *Pagurus* (Fabricius, 1775) (Anomura: Paguridae) from South America. **Zootaxa**, 3666 (4): 436-448.
- Oliveira, L.P.H. 1945. Verificação da existência de *Atya scabra* Leach, camarão d'água doce da família Atyidae, Crustacea, no nordeste do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 43 (2): 177-190.
- Oliveira, C.M.C.A. 2014. **Variabilidade genética do camarão de água doce *Atya scabra* (Leach, 1816) ao longo de sua distribuição geográfica (Decapoda, Caridea, Atyidae)**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil (Monografia de Bacharelado), 88 p.
- Oliveira, C.M.C.A.; Terossi, M. & F.L. Mantelatto. submetido-fev/2017. Phylogeographic structuring and genetic diversity across the Atlantic range of the widespread amphidromous shrimp *Atya scabra* (Leach, 1816) (Decapoda: Atyidae), **Biological Journal of the Linnean Society**.
- Ortmann, A.E. 1890. Die decapoden-krebse des Strassburger Museums, mit besonderer Berücksichtigung der von Herrn Dr. Döderlein bei Japan und bei den Liu Kiu-Inseln gesammelten und z. Z. im Strassburger Museum aufbewahrten Formen. I. Theil. Die Unterordnung Natantia (Boas) (Abtheilungen: Penaeidae und Eucyphidea = Caridae der Autoren). **Zoologische Jahrbücher. Abtheilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere**, 5: 437-542.

- Ortmann, A.E. 1894. A study of the systematic and geographical distribution of the decapod family Atyidae Kingsley. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 46: 397-416.
- Ortmann, A.E. 1895. A study of the systematic and geographical distribution of the decapod family Atyidae Kingsley. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 46: 397-416.
- Ortmann, A.E. 1897. Os camarões da água doce da America do Sul. **Revista do Museu Paulista**, 2: 173-216.
- Ovie, S.O. & S.S. Eze. 2013. Preliminary studies on the culture of *Atya crassa* in outdoor and indoor tanks. **Journal of fisheries and Aquatic Science**, 8 (1): 160-165.
- Page, T.J. & J.M. Hughes. 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. & J.M. Hughes. 2014. Contrasting insights provided by single and multi-species data in a regional comparative phylogeographic study. **Biological Journal of the Linnean Society**, 111: 554-569.
- Page, T.J.; von Rintelen, K. & J.M. Hughes. 2007a. 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.; von Rintelen, K. & J.M. Hughes. 2007b. Phylogenetic and biogeographic relationships of subterranean and surface genera of Australian Atyidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) inferred with mitochondrial DNA. **Invertebrate Systematics**, 21: 137-145.
- Page, T.J.; Cook, B.D.; von Rintelen, T.; von Rintelen, K. & J.M. Hughes. 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.; Torati, L.S.; Cook, B.D.; Binderup, A.; Pringle, C.M.; Reuschel, S., Schubart, C.D. & J.M. Hughes. 2013. Invertébrés sans frontières: Large scales of connectivity of selected freshwater species among Caribbean Islands. **Biotropica**, 45 (2): 236-244.
- Palacios, J.S.; Alvarez, R.B. & J.P.R. Lozano. 2008. Crecimiento y reproducción del camarón *Atya margaritacea* (Decapoda: Atyidae) en el Río Presidio, Sinaloa, México. **Revista de Biología Tropical**, 56 (2): 513-522.
- Palero, F. & K.A. Crandall. 2009. Phylogenetic Inference Using Molecular Data. *In*: Martin, J.W.; Crandall, K.A. & D.L. Felder (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues**, 18: 67-88.
- Palero, F.; Hall, S.; Clark, P.F.; Johnston, D.; Mackenzie-Dodds, J. & S. Thatje. 2010. DNA extraction from formalin-fixed tissue: new light from the deep sea. **Scientia Marina**, 74 (3): 465-470.
- Palumbi, S.R. & J. Benzie. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 1 (1): 27-34.
- Peck, S.B. 1975. The invertebrate fauna of tropical american caves, part III: Jamaica, an introduction. **International Journal of Speleology**, 7: 303-326.
- Pereira, G.A.S. 1991. Camarones de agua dulce de Venezuela II: Nuevas adiciones en las Familias Atyidae y Palaemonidae (Crustacea. Decapoda, Caridea). **Revista Acta Biologica Venezuelica**, 13 (1-2): 75-88.
- Phiri, E.E. & S.R. Daniels. 2016. Multilocus coalescent species delimitation reveals widespread cryptic differentiation among Drakensberg mountain-living freshwater crabs (Decapoda: Potamonautes). **Invertebrate Systematics**, 30: 60-74.
- Pileggi, L.A.G. 2009. **Sistemática Filogenética dos camarões do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 do Brasil: análises morfológicas e moleculares**. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. (Tese de Doutorado), 236 p.

- Pileggi, L.G.; Rossi, N.; Wehrtmann, I.S. & F.L. Mantelatto. 2014. Molecular perspective on the American transisthmian species of *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae). **ZooKeys**, 457: 109-131.
- Pons, J.; Barraclough, T.; Gomez-Zurita, J.; Cardoso, A.; Duran, D.; Hazell, S.; Kamoun, S.; Sumlin, W. & A. Vogler. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, 55: 595-609.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256.
- Postaire, B.; Magalon, H.; Chloé, A.; Bourmaud, F. & J.H. Bruggemann. 2016. Molecular species delimitation methods and population genetics data reveal extensive lineage diversity and cryptic species in Aglaopheniidae (Hydrozoa). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 105: 36-49.
- Pringle, C.M.; Blake, G.A.; Covich, A.P.; Buzby, K.M. & A. Finley. 1993. Effects of omnivorous shrimp in a montane tropical stream: sediment removal, disturbance of sessile invertebrates and enhancement of understory algal biomass. **Oecologia**, 93: 1-11.
- Pringle, C.M.; Hemphill, N.; McDowell, W.H.; Bednarek, A. & J.G. March. 1999. Linking species and ecosystems: different biotic assemblages cause interstream differences in organic matter. **Ecology**, 80 (6): 1860-1872.
- Puillandre, N.; Lambert, A.; Brouillet, S. & G. Achaz. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, 21: 1864-1877.
- Qian, G.; Zhao, Q.; Wang, A.; Zhu, L.; Zhou, K. & H. Sun. 2011. Two new decapod (Crustacea: Malacostraca) complete mitochondrial genomes: bearings on the phylogenetic relationships within the Decapoda. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 162: 471-481.
- Rambaut, A. 2009. FigTree v1.4.2. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>> Acesso em: out/2016.

- Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Xie, D. & A.J. Drummond. 2014. Tracer v1.6. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>> Acesso em: out/2016.
- Ramos-Porto, M. & P.A. Coelho. 1998. Malacostraca-Eucarida - Caridea (Alpheoidea excluded). In: **Catalogue of Crustacea of Brazil**. Volume 6, Young, P.S. (Ed.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, 325-350.
- Raupach, M.J. & A.E. Radulovici. 2015. Looking back on a decade of barcoding crustaceans. **ZooKeys**, 539: 53-81.
- R Development Core Team, 2013. R Development Core Team R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Em: <<http://www.R-project.org/>>.
- Richard, J.; De Grave, S. & P.F. Clark. 2012. A new atyid genus and species from Madagascar (Crustacea: Decapoda: Caridea). **Zootaxa**, 3162: 31-38.
- Rincón, J. & A.P. Covich. 2014. Effects of insect and decapod exclusion and leaf litter species identity on breakdown rates in a tropical headwater stream. **Revista de Biología Tropical**, 62 (2): 143-154.
- Robles, R. & D.L. Felder. 2015. Molecular phylogeny of the genus *Lepidophthalmus* (Decapoda, Callinassidae), with re-examination of its species composition. **Zootaxa**, 4020 (3): 453-472.
- Robles, R.; Schubart, C.D.; Conde, J.E.; Carmona-Suárez, C.; Alvarez, F.; Villalobos, J.L. & D.L. Felder. 2007. Molecular phylogeny of the American *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. **Marine Biology**, 150: 1265-1274.
- Rodríguez, G. 1982. Fresh-water shrimps (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Orinoco Basin and the venezuelan Guayana. **Journal of Crustacean Biology**, 2 (3): 378-391.
- Rodríguez, J.C.; Marcano, A.E. & L.A. Marcano. 1991. Tolerancia a la salinidad del camarón de río *Atya scabra* (Leach. 1815). **Zootecnia Tropical**, 9 (2): 195-205.

- Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A. & J.P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematics Biology**, 61 (3): 539-542.
- Rossi, N. & F.L. Mantelatto. 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.
- Roux, C.; Fraïsse, C.; Romiguier, J.; Anciaux, Y.; Galtier, N. & N. Bierne. 2016. Shedding light on the grey zone of speciation along a continuum of genomic divergence. **PLoS Biology**, 14 (12): e2000234.
- Roy, M.S. & R. Sponer. 2002. Evidence of a human-mediated invasion of the tropical Western Atlantic by the world's most common Brittlestar. **Proceedings: Biological Sciences**, 269 (1495): 1017-1023.
- Rutherford, T.C. 1971. Fresh-water shrimps in the area Cape Coast, Ghana. **Ghana Journal of Science**, 11 (2): 87-91.
- Santos, S.R. & D.A. Weese. 2011. Rocks and clocks: Linking geologic history and rates of genetic differentiation in anchialine organisms. **Hydrobiologia**, 677: 54-63.
- Schander, C. & K.M. Halanych. 2003. DNA, PCR and formalinized animal tissue - a short review and protocols. **Organism Diversity & Evolution**, 3: 195-205.
- Schram, F.R. 2009. On the origin of Decapoda. *In*: Martin, J.W.; Crandall, K.A. & D.L. Felder (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues**, 18: 3-13.
- Schoolmann, G.; Nitsche, F. & H. Arndt. 2015. Aspects of the life span and phenology of the invasive freshwater shrimp *Atyaephyra desmarestii* (Millet, 1831) at the northeastern edge of its range (upper rhine). **Crustaceana**, 88 (9): 949-962.

- Schubart, C.D. 2009. Mitochondrial DNA and decapod phylogenies; the importance of pseudogenes and primer optimization. *In*: Martin, J. W.; Crandall, K.A. & D.L. Felder (Eds.). Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Crustacean Issues**, 18: 47-65.
- Schubart, C.D. 2011. Reconstruction of phylogenetic relationships within Grapsidae (Crustacea: Brachyura) and comparison of trans-isthmian versus amphi-atlantic gene flow based on mtDNA. **Zoologischer Anzeiger**, 250: 472-478.
- Schubart, C.D.; Neigel, J.E. & D.L. Felder. 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues**, 12 (2): 817-830.
- Shedlock, A.M.; Haygood, M.G.; Pietsch, T.W. & P. Bentzen. 1997. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. **BioTechniques**, 22 (3): 394-400.
- Sites, J.W., Jr. & J. Marshall. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 18 (9): 462-470.
- Sites, J.W., Jr & J. Marshall. 2004. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 35: 199-227.
- Silva, M.J.; Creer, S.; Santos, A.; Costa, A.C.; Cunha, M.R.; Costa, F.O. & G.R. Carvalho. 2011. Systematic and evolutionary insights derived from mtDNA COI barcode diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). **PLoS ONE**, 6 (5): e19449.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, 236: 787-792.
- Smith, S.I. 1871. List of the Crustacea collected by J. A. McNeil in Central America. **Report of the Peabody Academy of Science**, 1869: 87-98.

- Snyder, M.N.; Anderson, E. & C.M. Pringle. 2011. A migratory shrimp's perspective on habitat fragmentation in the neotropics: Extending our knowledge from Puerto Rico. *In*: A. Asakura (Ed.). **New Frontiers in Crustacean Biology**. Proceedings of the TCS Summer Meeting, Tokyo, 20-24 September 2009. Brill, Leiden, The Netherlands, 15: 169-182.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, 30 (9): 1312-1313.
- Stamatakis, A.; Hoover, P. & J. Rougemont. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Systematic Biology**, 57 (5): 758-771.
- Talavera, G.; Dinca, V. & R. Vila. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, 4: 1101-1110.
- Tamura, K. & M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, 10: 512-526.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 2725-2729.
- Tang, C.Q.; Humphreys, A.M.; Fontaneto, D. & T.G. Barraclough. 2014. Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. **Methods in Ecology and Evolution**, 5: 1086-1094.
- Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R.H. & A.P. Vogler. 2003. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, 18 (2): 70-74.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22 (22): 4673-4680.

- Thorpe, T. & B. Lloyd. 1999. The macroinvertebrate fauna of St. Lucia elucidated by canonical correspondence analysis. **Hydrobiologia**, 400: 195-203.
- Timm, L. & H.D. Bracken-Grissom. 2015. The forest for the trees: Evaluating molecular phylogenies with an emphasis on higher-level Decapoda. **Journal of Crustacean Biology**, 35 (5): 577-592.
- Torati L.S. & F.L. Mantelatto. 2012. Ontogenetic and evolutionary change of external morphology of the neotropical shrimp *Potimirim* (Holthuis, 1954) explained by a molecular phylogeny of the genus. **Journal of Crustacean Biology**, 32 (4): 625-640.
- Torsvik, T.H.; Rousse, S.; Labails, C. & M.A. Smethurst. 2009. A new scheme for the opening of the South Atlantic Ocean and the dissection of an Aptian salt basin. **Geophysical Journal International**, 177: 1315-1333.
- Turkmen, G. & O. Karadal. 2012. The survey of the imported freshwater decapod species via the ornamental aquarium trade in Turkey. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 11 (15): 2824-2827.
- Vera-Silva, A.L.; Carvalho, F.L. & F.L. Mantelatto. 2016. Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in Brazil reveal evidence of non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. **Journal of Crustacean Biology**, 36 (3): 373-383.
- Villalobos, A.F. 1943. **Estudio morfológico de la *Atya scabra* (Crust. Decap.)**. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. (Dissertação de Mestrado), 70 p.
- Villalobos, A.F. 1956. Contribucion al conocimiento de los Atyidae de Mexico. I. Una nueva especie de *Atya* de la vertiente del Pacifico del Estado de Michoacan. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México**, 26 (2): 459-475.

- Villalobos, J.L. & F. Alvarez. 1997. **Atyidae (burritos, camaroncitos)**. In: Soriano, E.G.; Oirzo, R. & R.C. Vogt (Eds.). Historia Natural de Los Tuxtlas. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Ciudad de México, 401-403.
- Villalobos-Hiriart, J.L.; Alvarez, F.; Hernández, C.; Lanza-Espino, G. & I.D. González-Mora. 2010. Crustáceos decápodos de las cuencas Copalita, Zimatán y Coyula, en Oaxaca, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, 81: 99-111.
- Villalobos, J.; De Grave, S.; Mantelatto, F.L. & F. Alvarez. 2013. *Atya ortmannioides*. (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T197585A107023907.
- von Rintelen, K.; Page, T.J.; Cai, Y.; Roe, K.; Stelbrink, B.; Kuhajda, B.R.; Iliffe, T.M.; Hughes, J. & T. von Rintelen. 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.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, 29: 188-197.
- Weiss, R.; Anger, K.; Hayd, I. & C.D. Schubart. 2015. Interpreting genetic distances for species recognition: the case of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 and the recently described *M. pantanalense* dos Santos, Hayd & Anger, 2013 (Decapoda, Palaemonidae) from brazilian fresh waters. **Crustaceana**, 88 (10-11): 1111-1126.
- Wiegmann, A. 1836. Beschreibung einiger neuen Crustaceen des Berliner Museums aus Mexiko und Brasilien. **Archiv für Naturgeschichte**, 2: 145-151.
- Will, K.W.; Mishler, B.D. & Q.D. Wheeler. 2005. The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, 54: 844-845.

- Wright, M.S. & A.P. Covich. 2005. The effect of macroinvertebrate exclusion on leaf breakdown rates in a tropical headwater stream. **Biotropica**, 37 (3): 403-408.
- Xia, X. 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 30 (7): 1-9.
- Xia, X. & P. Lemey. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. *In: The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. 2nd edition. Lemey, P.; Salemi, M. & A.M. Vandamme (Eds.) Cambridge University Press, Cambridge, 615-630.
- Xia, X.; Xie, Z.; Salemi, M.; Chen, L. & Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26: 1-7.
- Yule, G.U. 1925. A mathematical theory of evolution based on the conclusions of Dr. J. C. Willis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London B**, 213: 21-87.
- Zhang, D. & G.M. Hewitt. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Tree**, 2 (6): 247-251.
- Zhang, J.; Kapli, P.; Pavlidis, P. & A. Stamatakis. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, 29: 2869-2876.